

**Untersuchungen zum Verwandtschaftsverhältnis der
europäischen Schweineinfluenzaviren
A/swine/Nordirland/38 und A/swine/Cambridge/39 zu
porcinen und humanen H1N1 Virusstämmen**

Disbui. München

1989

Elisabeth Neumeier



Aus der Abteilung für Virologie
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der
Technischen Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. H. Meier-Ewert

vorgelegt über das

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Untersuchungen zum Verwandtschaftsverhältnis der
europäischen Schweineinfluenzaviren A/swine/Nordirland/38
und A/swine/Cambridge/39 zu porcinen und humanen
H1N1 Virusstämmen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Elisabeth Neumeier
aus Gerzen

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Berner

Tag der Promotion: 28. Juli 1989

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0004

	Inhalt	Seite
1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Morphologie der Influenzaviren	3
2.1.1	Hämagglutinin	4
2.2	Biologische Funktionen des Hämagglutinins	6
2.2.1	Antigenität	6
2.2.2	Rezeptorbindung	9
2.2.3	Fusion	11
2.3	Genom der Influenza A Viren	12
2.3.1	RNA Segment 4 (Nukleotid- und Aminosäuresequenz)	14
2.4	Antigenetische Variation	15
2.5	Variationsuntersuchungen am Beispiel des Hämagglutinins	16
2.5.1	Untersuchung phänotypischer Eigenschaften	16
2.5.2	Untersuchung des Genoms	17
2.6	Klassifizierung und Nomenklatur	19
2.7	Ökologie der Influenzaviren in ihren Wirtsspezies	21
2.7.1	Mensch	21
2.7.2	Schwein	26
2.7.3	Hinweise auf zwischenartliche Übertragungen von H1N1 Influenzaviren	28
2.7.4	Andere Säugetierspezies	31
2.7.5	Vögel	32

3	Eigene Untersuchungen	35
3.1	Material und Methoden	35
3.1.1	Virusvermehrung im embryonierten Hühnerbrutei	35
3.1.2	Herstellung und Lagerung von Virusstämmen	35
3.1.3	Antigene und Antiseren	36
3.1.4	Hämagglutinationstest	37
3.1.5	Hämagglutinationsinhibitionstest	38
3.1.6	Virusreinigung	39
3.1.7	RNA-Extraktion	40
3.1.8	Photometrische Quantifizierung und Reinheitsprüfung von RNA Präparationen	41
3.1.9	Elektrophoretische Auftrennung von cDNA Fragmenten in Polyacrylamidgelen	42
3.1.9.1	Direktsequenzierung viraler RNA mit Hilfe hämagglutinin-spezifischer, synthetischer Oligonukleotidprimer und AMV Reverser Transkriptase	42
3.1.9.2	Vorbereitung der Glasplatten	46
3.1.9.3	Herstellung von Sequenziergelen	47
3.1.9.4	Elektrophoretische Auftrennung	48
3.1.9.5	Autoradiographie	48
3.2	Ergebnisse	49
3.2.1	Vergleichende Untersuchungen der antigenetischen Eigenschaften von Hämagglutininen humaner und porciner Influenza A H1N1 Stämme mit Hyperimmunseren gegen verschiedene Isolate vom Subtyp H1N1	49
3.2.1.1	Reaktionen mit Antiseren gegen klassische Schweineinflenzaviren (1937-1976)	49
3.2.1.2	Reaktionen mit Antiseren gegen europäische Schweineinflenzaviren (1938-1939)	52
3.2.1.3	Reaktionen mit Antiseren gegen humane Influenzaviren (1933-1978)	52

3.2.2	Vergleichende Untersuchungen der antigenetischen Eigenschaften humaner und porciner Influenza A H1N1 Stämme mit monoklonalen Antikörpern gegen humane H1N1 Influenzastämme	56
3.2.3	Bestimmung von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	57
3.2.3.1	Influenza A/swine/29/37, A/swine/Nordirland/38 und A/swine/Cambridge/39	58
3.2.3.2	Influenza A/NWS/33	58
3.2.4	Vergleich von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	59
3.2.4.1	Influenza A/swine/Iowa/15/30, A/swine/29/37 und A/New Jersey/11/76; Erstellung einer Referenzsequenz für weitere Vergleiche	59
3.2.4.2	Influenza A/WSN/33 und A/NWS/33	62
3.2.4.3	Influenza A/swine/29/37, A/swine/Nordirland/38, A/swine/Cambridge/39, A/PR/8/34, A/WSN/33 und A/New Jersey/11/76	66
3.2.4.3.1	Anzahl der Austausche	75
3.2.4.3.2	Anordnung der Austausche im Molekül	78
3.2.4.3.3	Art der Austausche	80
3.2.4.3.4	Glykosylierungsstellen	81
3.2.5	Ursprung der Hämagglutiningene von A/swine/Nordirland/38 und A/swine/Cambridge/39	83
3.2.6	Ausblick auf humane H1N1 Stämme nach 1950	85
4	Besprechung der Ergebnisse	91
5	Zusammenfassung	102
6	Literaturverzeichnis	107

Abkürzungen

AGPT	Agargelpräzipitationstest
AMV	Aviäres Myeloblastosis Virus
APS	Ammoniumpersulfat
cRNA	Copy RNA
C-Terminus	Carboxyterminus
3D-Struktur	Dreidimensionale Struktur
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
HA	Hämagglutinin
HAU	Hämagglutinierende Einheit
HI	Hämagglutinationsinhibitionstest
KBR	Komplementbindungsreaktion
M	Matrixprotein
MAK	Monoklonaler Antikörper
MG	Molekulargewicht
mRNA	Messenger RNA
NA	Neuraminidase
NP	Nukleoprotein
N-Terminus	Aminoterminal
O.D.	Optische Dichte
ON-Primer	Oligonukleotidprimer
RDE	Rezeptorzerstörendes Enzym
SA α 2,6Gal	N-Azetylneuraminsäure- α 2,6-Galaktose
SA α 2,3Gal	N-Azetylneuraminsäure- α 2,3-Galaktose
ssRNA	einzelsträngige (single stranded) RNA
TEMED	Tetramethyläthylendiamin
UpM	Umdrehungen pro Minute
vRNA	virale RNA

Für das Verständnis der Epidemiologie und Epizootiologie von Influenza A Viren sind die Gesetzmäßigkeiten, nach denen Influenza A Viren zwischen verschiedenen Spezies übertragen werden, von großem Interesse.

Die ersten animalen Influenzaviren, die mit Influenzaepidemien in Zusammenhang gebracht werden konnten, waren Schweineinfluenzaviren vom Subtyp H1N1. In den Jahren 1918-19 fielen der "Spanischen Grippe" weltweit mehr als 20 Mio. Menschen zum Opfer. Zur selben Zeit trat in den USA zum ersten Mal eine grippeähnliche Erkrankung bei Schweinen auf. Rückblickend wurde nachgewiesen, daß die Erreger der "Spanischen Grippe" mit den Erregern der Schweineinfluenza identisch, oder zumindest sehr nahe verwandt waren. Bis heute ist ungeklärt, ob die Viren von Mensch zu Schwein, oder von Schwein zu Mensch übertragen wurden.

Das Hämagglutinin ist eine wichtige Determinante für die Virulenz eines Influenzastammes und das Zielantigen für neutralisierende Antikörper. Eine Veränderung seiner Antigenität durch "Drift" oder "Shift" kann daher einen Selektionsvorteil für das Virus bedeuten.

Die antigenetischen Eigenschaften der Hüllantigene (Hämagglutinin und Neuraminidase) von Influenza A Viren, die im Menschen zirkulieren, wandeln sich aufgrund des Selektionsdruckes, den die hohe Populationsimmunität ausübt, sehr rasch. Im Gegensatz zu den humanen Influenzaviren blieben die antigenetischen Merkmale der Schweineinfluenzaviren über Jahrzehnte hinweg beinahe unverändert.

In Europa wurden 1938 und 1939 die ersten Schweineinfluenzastämme (A/swine/Nordirland/38, A/swine/Cambridge/39) isoliert. Die antigenetischen Eigenschaften ihrer Hämagglutinine unterscheiden sich von der sonst überaus homogenen Gruppe der Schweineinfluenzastämme aus den USA. Darüber hinaus sind sie untereinander nicht identisch.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war:

1. die antigenetischen Eigenschaften des Hämagglutinins der in Europa isolierten Schweineinfluenzastämme sw/Nordirland/38 und sw/Cambridge/39 im Hämagglutinationsinhibitionstest (HI) zu untersuchen;
2. für drei Schweineinfluenzavirus Hämagglutinine die Nukleotidsequenz zu bestimmen, die den HA₁ Anteil des Proteins kodiert;



3. die aus den Nukleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit bereits veröffentlichten Sequenzen von H1-Hämagglutininen zu vergleichen;
4. den Ursprung der Hämagglutinine von sw/Nordirland/38 und sw/Cambridge/39 zu diskutieren.

2.1 Morphologie der Influenzaviren

Die pleomorphen sphärischen (80-100 nm Durchmesser) oder filamentösen (bis 4000 nm Länge) Partikel der Influenzaviren besitzen eine Lipidhülle, die von der Plasmamembran der Wirtszelle stammt. Mit einer hydrophoben Sequenz von Aminosäuren sind darin als Projektionen (spikes) die beiden Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) verankert, wobei das Mengenverhältnis etwa 4:1 beträgt. Die beiden Hüllproteine besitzen subtypspezifische antigene Determinanten. Das stabförmige Hämagglutinin, das Rezeptorbindungs- und Fusionsaktivität besitzt, ist aus drei Monomeren zusammengesetzt, während die Neuraminidase, die rezeptorzerstörende Aktivität besitzt, als Tetramer aus einem dünnem Stengel, der in die Lipidmembran eingelassen ist, und einer globulären Kopffregion besteht. Die Lipidhülle ist unterlegt mit einer Schicht des Matrixproteins (M1), welches den größten Mengenanteil des Virusgesamtproteins stellt. Dieses Strukturprotein ist ein typenspezifisches Antigen, das im AGPT keine Kreuzreaktionen mit anderen Typen zeigt (Schild, 1972). Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das helikale, symmetrische Nukleokapsid (9-15 nm Durchmesser). Es besteht aus acht RNA Molekülen unterschiedlicher Größe (McGeoch et al., 1976), dem Nukleoprotein (NP) und drei verschiedenen Polymeraseproteinen (PB1, PB2, PA), die zusammen als virionassoziierte RNA-Transkriptase die RNA Transkription in der infizierten Zelle ausführen (Horisberger, 1980; Ulmanen et al., 1981; Szewczyk et al., 1988). Das NP trägt ebenfalls stabile antigenetische Determinanten, mit denen eine Typisierung in der KBR möglich ist (Stuart-Harris et al., 1985). Influenzaviren haben eine Dichte von 1.24 g/cm³. Hitze (56°C, 30 Minuten), pH-Werte unter 3.0 oder Äther-, bzw. Chloroformbehandlung zerstören die Infektiosität der Influenzaviren.

2.1.1 Hämagglutinin

Das stabförmige Hämagglutinin ist aus drei Monomeren zusammengesetzt, die sich in Form einer linksläufigen Superhelix um 100° umeinander winden und etwa 135 Å über die Virusmembran hinausragen (Wilson et al., 1981). Jedes Monomer baut sich aus zwei verschiedenen Untereinheiten (HA₁ und HA₂) auf, die bei der posttranslationalen proteolytischen Spaltung des Hämagglutinins entstehen (Klenk et al., 1975, 1977). Das aminotermineale HA₁ Fragment (MG 47000) und das carboxyterminale HA₂ Fragment (MG 29000) bleiben über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Ward, 1981) (Abb. 1).

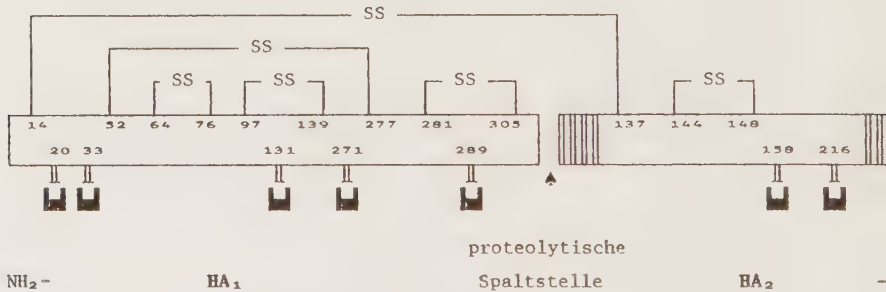


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Polypeptidkette des Hämagglutinins.

In der Abbildung ist die proteolytische Spaltstelle (▲) zwischen dem HA₁ und HA₂ Fragment, die hydrophoben Regionen (|||||) (aminotermineale Fusionspeptid und Membrananker) der HA₂ Untereinheit, die Disulfidbrücken (-SS-) mit den Nummern der entsprechenden Cysteine und die Kohlenhydratanheftungsstellen (■) (Asn-X-Ser/Thr) des Hämagglutinins von Influenza A/PR/8/34 (Winter et al., 1981), jeweils mit der Nummer des Asparagins dargestellt.

Die proteolytische Spaltung ist mit einer (ersten) Konformationsänderung des Hämaggglutininmoleküls verbunden, daher liegen im gespaltenen Hämaggglutinin der C-Terminus der HA₁ Untereinheit und der N-Terminus der HA₂ Untereinheit 22 Å voneinander entfernt (Wiley & Skehel, 1987). Das kleinere HA₂ Fragment enthält nahe seinem Carboxyterminus eine hydrophobe Aminosäuresequenz, die als Membrananker dient. Die aminoterminal Sequenz des HA₂ Fragments, die im Inneren des Moleküls 35 Å von der Virusmembran entfernt liegt, ist an der Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran beteiligt (White et al., 1982).

Zusammen mit einigen Abschnitten des HA₁ Fragments formt die HA₂ Untereinheit eine Stammstruktur von etwa 76 Å Länge, bestehend aus zwei antiparallel verlaufenden α -Helices (Abb. 2).



Abbildung 2: Dreidimensionales Modell des Hämaggglutininmonomers.

Nach: Wilson et al. (1981), verändert.

Der größte Teil des HA₁ Fragments ist zu einem globulären Gebilde aufgeknäuelte, das als "Kopfregion" bezeichnet wird. Acht antiparallel gefaltete β -Faltblattstrukturen bilden deren distalen Anteil, in dem die Rezeptorbindungstasche und die variablen antigenetischen Determinanten lokalisiert sind. Die Anzahl und Anordnung der Glykosylierungsstellen im Hämagglutinin ist stammspezifisch unterschiedlich (Wilson et al., 1981).

2.2 Biologische Funktionen des Hämagglutinins

2.2.1 Antigenität

Von den vier Strukturproteinen der Influenzaviren, die als Antigene wirken, verhalten sich die internen Strukturproteine (Matrixprotein und Nukleoprotein) stabil und typenspezifisch. Hämagglutinin und Neuraminidase sind als Oberflächenantigene für Antikörper leicht zugänglich. Der daraus resultierende Selektionsdruck führt über die Akkumulation von Mutationen (Drift) oder den Austausch von Gensegmenten (Shift) zu einer ständigen Veränderung der Antigenität von Hämagglutinin und Neuraminidase.

Neutralisierende Antikörper sind ausschließlich gegen das Hämagglutinin gerichtet, dessen biologische Funktionen eine *conditio sine qua non* im Replikationszyklus der Influenzaviren sind. Als Mechanismen der Neutralisierung wurden u.a. die Blockierung der Rezeptorbindungsstelle und die Blockierung der zweiten Konformationsänderung (und damit der Fusionsaktivität) diskutiert (Yoden et al., 1985). Mutationen im Hämagglutinin, die das Virus der Neutralisation durch Antikörper entziehen, sind daher mit Selektionsvorteilen für das Virus verbunden, sofern sie nicht andere biologische Aktivitäten nachteilig beeinflussen.

Die Summe der molekular-epidemiologischen Vorgänge bei Antigendrift und -shift spiegelt sich in serologischen Tests wieder. Deshalb sind polyklonale Postinfektions- oder Hyperimmunseren geeignet, um antigenetische Verwandtschaften von Stämmen zu charakterisieren.

Die Herstellung monoklonaler Antikörper (Köhler & Milstein, 1975), die Bestimmung von Nukleotidsequenzen (Maxam & Gilbert, 1977; Sanger et al., 1977) sowie die Aufklärung der Tertiärstruktur eines H3 Hämagglutinins

(Wilson et al., 1981) haben die Voraussetzungen geschaffen, um phänotypische antigenetische Eigenschaften mit der Primär-, Sekundär- oder Tertiärstruktur eines viralen Proteins korrelieren zu können.

Auf dem Hämagglutinin des Influenzastammes A/PR/8/34 (H1N1) sind mit fünf verschiedenen Familien monoklonaler Antikörper vier Antigenorte identifizierbar (Gerhard & Webster, 1978; Gerhard et al., 1981). Durch eine Sequenzanalyse von Varianten, die mit monoklonalen Antikörpern selektiert worden waren, konnten Wiley et al. (1981) für ein Hämagglutinin vom Subtyp H3, und Caton et al. (1982) für ein Hämagglutinin vom Subtyp H1 einzelne Aminosäuren definieren, deren Austausch eine grundlegende Änderung der Antigenität nach sich zieht, die also entweder direkt an der Antikörperbindung beteiligt sind oder gravierende Konformationsänderungen induzieren (Caton et al., 1982). Im dreidimensionalen Modell des Hämagglutinins liegen die in der Primärsequenz scheinbar regellos verteilten Aminosäuren alle bis auf eine Ausnahme an den Außenflächen der Kopfregion. Die Lage der mutierten Aminosäuren und die Spezifität der monoklonalen Antikörper, die zur Selektion verwendet wurden, erlauben die Zuordnung von Mutationshäufungen im dreidimensionalen Modell zu den bekannten Antigenorten (Laver et al., 1979; Gerhard et al., 1981; Nakajima et al., 1983). Die Orte Sa und Sb liegen im oberen Teil der Globulärstruktur des Hämagglutinins, distal der Rezeptorbindungstasche (Abb. 3). Diese Regionen liegen so eng beieinander, daß die gleichzeitige Bindung von Antikörpern an den beiden Antigenorten unmöglich ist (Lubeck & Gerhard, 1981). Die beiden Untergruppen Ca1 und Ca2 der dritten Bindungsstelle Ca liegen in großem räumlichen Abstand, proximal der Rezeptorbindungsstelle. Das 3D-Modell zeigt, daß wahrscheinlich die Ca1 und Ca2 Untergruppen benachbarter Monomere eine funktionelle Einheit bilden, da sie im Trimer nur durch einen schmalen Spalt getrennt sind (Caton et al., 1982). Die vierte Bindungsstelle Cb liegt im proximalen Teil der globulären Kopfregion an der Außenfläche des Moleküls.

Caton et al. (1982) beobachteten, daß die Bindung einiger monoklonaler Antikörper durch Mutationen in verschiedenen Antigenorten beeinflusst wurde. Sie schlossen daraus, daß möglicherweise die vier Antigenorte Sa, Sb, Ca und Cb als immunodominante Regionen, die am häufigsten von Antikörpern erkannt werden, in ein großes, zusammenfließendes antigeneti-

sches Areal eingelassen sind, das insgesamt die Antikörperbindung beeinflusst. Underwood (1982) bestätigte diese Vorstellung, daß Aminosäuren, ohne tatsächlich Antikörperbindungsstellen zu sein, die Antikörperbindung beeinflussen können. Die topographischen Orte der Aminosäuren, die die Antikörperbindung beeinflussen überlappen untereinander und bilden einen kontinuierlichen Ring um die Rezeptorbindungsstasche. Die tatsächlichen Antikörperbindungsstellen können innerhalb dieser Region diskret oder überlappend liegen.

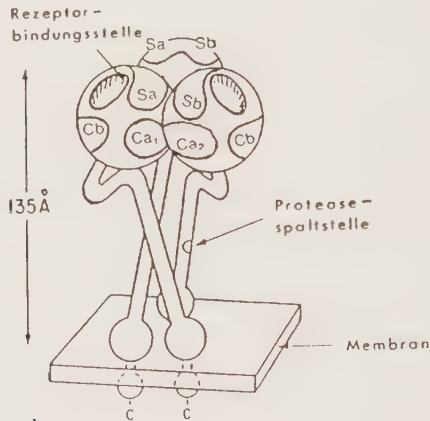


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Antigenorte des Influenza A/PR/8/34 (H1N1) Hämagglutinintrimers.

Die Abbildung zeigt die Anordnung der Antigenorte (Sa, Sb, Ca1, Ca2 und Cb) und die Lage der Rezeptorbindungsstelle auf dem Hämagglutinintrimer.

Nach: Caton et al. (1982); verändert.

Die unterschiedliche Antigenität von Varianten kann durch die Maskierung von Aminosäureresten durch Oligosaccharidketten bedingt sein (Verhoeven et al., 1980; Wiley et al., 1981; Caton et al., 1982). Antigenetische Determinanten, die ab dem ersten Auftreten eines Subtyps durch Zuckerseitenketten vor dem Zugriff von Antikörpern geschützt waren, veränder-

ten sich im Lauf der Antigendrift nur wenig (Air & Laver, 1986). Im HA₁ Anteil von Hämagglutininen des Subtyps H1 beträgt die Anzahl möglicher Glykosylierungsstellen zwischen fünf (A/PR/8/34 (Winter et al., 1981)) und neun (A/Singapore/6/86 (Stevens et al., 1987)).

Daß die Resultate der Untersuchungen von Wiley et al. (1981) und Caton et al. (1982) auch in vivo Gültigkeit haben, bestätigte eine Sequenzanalyse natürlich vorkommender Varianten, deren Aminosäureaustausche einen Selektionsvorteil gegenüber den zirkulierenden Stämmen bedeutet hatten (Wiley et al., 1981; Both & Sleight, 1981; Skehel et al., 1983). Allerdings können einige dieser Mutationen auch andere biologische Funktionen (z.B. Rezeptorbindung oder Fusionsaktivität) beeinflussen, oder zufällig sein.

In vielen Stämmen findet man Mutationen, die zwar das antigenetische Verhalten beeinflussen, aber mit großer Sicherheit erst durch die Adaptation an das Wachstum im embryonierten Hühnerei entstanden sind (Raymond et al., 1986; Robertson et al., 1987; Oxford et al., 1987; Katz & Webster, 1988; DeJong et al., 1988).

Ausgehend von einem völlig anderen Denkansatz bestimmten Concannon et al. (1984) mit einer "moving average analysis" in den Nukleotidsequenzen von Hämagglutininen verschiedener Subtypen hypervariable Regionen, in denen überdurchschnittlich viele Mutationen zusammenfielen. Die Regionen decken sich teilweise mit den Antigenorten nach Wiley et al. (1981) und Caton et al (1982).

2.2.2 Rezeptorbindung

Zelloberflächenrezeptoren, die von Influenza A Viren erkannt werden, enthalten endständige N-Azetyl-Neuraminsäurereste. Die Abspaltung der Neuraminsäure von Zelloberflächenglykoproteinen und -lipiden verunmöglicht die Rezeptorbindung (Gottschalk, 1954). Der Ort der Rezeptorbindung ist eine Einbuchtung am distalen Ende des Hämagglutinins (Rogers et al., 1983, 1985), deren Boden und Seitenflächen von konservierten Aminosäureresten begrenzt werden (Wilson et al., 1981) (Abb. 4).

Aminosäurereste in "zweiter Reihe" stabilisieren zusätzlich die räumliche Struktur der Rezeptorbindungstasche (Wharton et al., 1988a).

Die röntgenkristallographische Strukturanalyse eines H3 Hämagglutinins im Komplex mit dem Rezeptoranalogue Sialyllaktose zeigte, daß die Seitenketten der Aminosäuren 98, 134-137, 153, 183, 190, 194, 226 und 228 funktionell an der Rezeptorbindung beteiligt sind, indem sie über Wasserstoffbrückenbindungen oder Van der Waals-Kontakte mit dem Rezeptoranalogue interagieren (Weis et al., 1988). Die Aminosäure 226 des X-31 Hämagglutinins (H3) ist mit der Bindungsspezifität für SAA2,6Gal, bzw. SAA2,3Gal korreliert, sowie mit der Sensitivität gegenüber Pferdeserum-inhibitor und der Replikation des Virus in der Bursa und/oder Intestinum von Vögeln (Naeve et al., 1984). Es gibt bisher keine detaillierten Untersuchungen zur Rezeptorbindungsaktivität und -spezifität von H1 Hämagglutininen, doch scheint auch hier die Aminosäure 226 einen Einfluß auf die Rezeptorbindung auszuüben (Nobusawa & Nakajima, 1988). In der Umgebung der Rezeptorbindungstasche liegen viele Aminosäuren, deren antigenetische Bedeutung bekannt ist und die dementsprechend überdurchschnittlich variabel sind, während die Aminosäuren der Rezeptorbindungsstelle hochkonserviert sind (Rogers et al., 1983; Wiley et al., 1981).

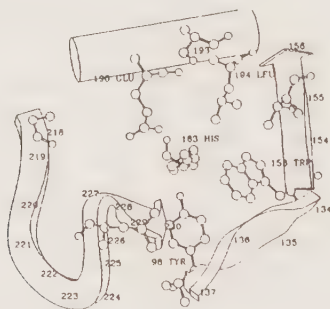


Abbildung 4: Schematische Zeichnung der Rezeptorbindungsstelle des Influenza A X-31 Hämagglutinins.

Aus: Daniels et al. (1987)

Die gleichzeitige Beeinflussung von antigenetischem Verhalten und Rezeptorspezifität durch den Austausch einzelner Aminosäuren konnte mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern in Rezeptorbindungsvarianten nachgewiesen werden (Daniels et al., 1984), sowie in Varianten die mit monoklonalen Antikörpern selektiert worden waren, und in natürlich vorkommenden Varianten (Underwood, 1984, 1987; Yewdell et al., 1986).

2.2.3 Fusion

Die am höchsten konservierte Sequenz im Hämagglutininmolekül ist eine Sequenz von 10 Aminosäuren am N-terminalen Ende der HA₂ Untereinheit. Sie ist der N-terminalen Sequenz des Fusionspeptids von Paramyxoviren analog (Skehel & Waterfield, 1975; Gething et al., 1978). Auch im Hämagglutinin ist dieses Peptid an der Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran beteiligt (White et al., 1982). Die posttranslationale proteolytische Spaltung unter Verlust eines Argininrestes ist deshalb essentiell für die Infektiosität der Influenzaviren (Lazarowitz & Chopin, 1975; White et al., 1982), weil erst dadurch das Fusionspeptid am N-terminalen Ende des HA₂ Fragmentes freigelegt wird (Skehel et al., 1982; Daniels et al., 1983b).

Im neutralen pH-Bereich liegt das Fusionspeptid nur 35 Å von der Virusmembran entfernt im Zentrum des Trimers verborgen (Wilson et al., 1981).

Nachdem das komplette Influenzavirus durch Endozytose in eine zytoplasmatische Vakuole aufgenommen worden ist, senkt eine membranständige Protonenpumpe den endosomalen pH-Wert auf Werte zwischen 5.0 und 6.2. Dies löst am Hämagglutinin eine (zweite) Konformationsänderung aus, wobei einige Bereiche des Moleküls als Scharnier zu fungieren scheinen, so daß ganze Domänen gegeneinander verschoben werden (Skehel et al., 1982; Wharton et al., 1988b). Die distalen, globulären Anteile des Trimers weichen auseinander (Daniels et al., 1983a) und das Hämagglutinin erhält eine gestrecktere Gestalt. Sekundärstrukturen bleiben dabei vollständig erhalten. In dieser Niedrig-pH-Struktur liegt das vorher im Inneren des Trimers lokalisierte Fusionspeptid nun so exponiert, daß es im Endosom die Fusion von viraler und endosomaler Membran vermitteln kann.

Die acht Segmente einzelsträngiger RNA (McGeoch et al., 1976) kodieren sieben Strukturproteine und mindestens drei Nicht-Strukturproteine, die nur in der infizierten Zelle gefunden werden. Die RNA liegt in negativer Polarität vor und wird, nach dem in Abbildung 5 dargestellten Schema, im ersten Transkriptionsschritt durch eine virionassoziierte RNA-abhängige RNA-Transkriptase in mRNA und "full-length" cRNA transkribiert. Isolierte RNA von Influenzaviren ist daher nicht infektiös.

Dreizehn Nukleotide des 5'-Endes und zwölf Nukleotide des 3'-Endes jedes der acht Segmente sind identisch und teilweise umgekehrt komplementär. In allen Segmenten ist eine Uridinsequenz, 15-21 Nukleotide vom 5'-Ende entfernt konserviert, an der der "Poly-A-Tail" der mRNA transkribiert wird. Die terminalen Sequenzen spielen eine Rolle in der Transkriptions- und Translationsinitiation (Lamb & Choppin, 1983).

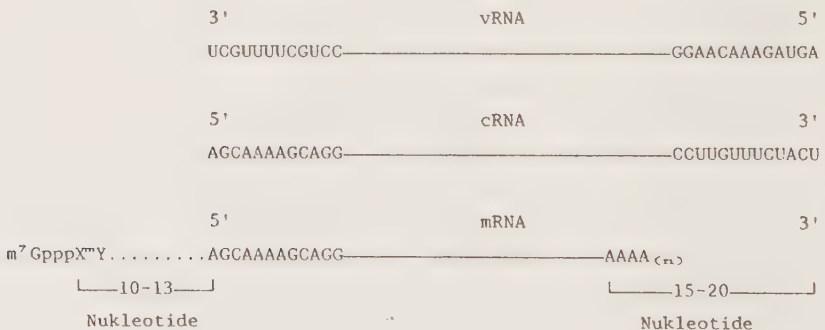


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Influenza Virus RNA (vRNA) und ihrer Transkripte (mRNA und cRNA).

Nur die konservierten Nukleotide der 3'- und 5'-Enden sind ausgeschrieben.

Nach: Lamb & Choppin (1983)

Die Größe der RNA Segmente von Influenza A/PR/8/34 (H1N1) liegt zwischen 2341 und 890 Nukleotiden; insgesamt besteht das virale Genom aus 13588 Nukleotiden mit einem Molekulargewicht von 4.9×10^6 Dalton (Desselberger & Palese, 1978). Einige Merkmale der acht RNA Segmente und ihrer Genprodukte sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1:

Die RNA Segmente von Influenza A Viren und ihre Genprodukte.

R N A - S E G M E N T E								
Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8
virale RNA Anzahl Nukleotide	2341	2341	2233	1778	1565	1413	1027	890
mRNA(s) Anzahl Nukleotide	2320	2320	2211	1757	1540	1392	1005 316 276	868 395
G E N P R O D U K T E								
Abkürzung	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M1 M2 (M3) ^a	NS1 NS2
Anzahl Aminosäuren	759	757	716	566	498	454	252 96 (9) ^b	230 121
Molekulargewicht (kDalton)	90	90	90	75-80	60	60	25 15 ?? ^c	25 11

Nach: Lamb & Choppin (1983)

^aDas dritte Genprodukt M3 des RNA Segmentes 7 wird bisher nur wegen des Vorhandenseins eines dritten Leserahmens angenommen und ist deshalb in Klammern gesetzt.

^bDie Anzahl von neun Aminosäuren für das Genprodukt M3 ist eine rechnerische Größe und deshalb in Klammern gesetzt.

^cDas Molekulargewicht des Genprodukts M3 ist als unbekannte Größe mit einem Fragezeichen in die Tabelle eingetragen.

Porter et al. (1979) bestimmten die erste vollständige Nukleotidsequenz eines RNA Segmentes, welches das Hämagglutinin eines Influenza A Virus (A/FPV/Rostock/34, Subtyp H7) kodiert. Inzwischen kennt man die Nukleotidsequenzen einer großen Anzahl von Hämagglutininen verschiedenster Subtypen, sowie die aus den Nukleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

1981 bestimmten Winter et al. (1981) die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des RNA Segmentes 4 vom Stamm A/PR/8/34 (Subtyp H1). Das RNA Segment ist 1778 Nukleotide lang, davon sind am 5'-Ende 32 Nukleotide dem Startkodon (AUG) vorangestellt. Die 1698 Nukleotide der translatierten Region kodieren 566 Aminosäuren. Bis zum 3'-Ende des RNA Segmentes folgen weitere 49 nicht translatierte Nukleotide.

In der translatierten Polypeptidkette befindet sich vor dem aminoterminalen Ende des Hämagglutinins die hydrophobe Signalsequenz (17 Aminosäuren), die posttranslational abgespalten wird. Es folgen die 549 Aminosäuren des Vorläuferproteins HA₀, das posttranslational durch das Zusammenwirken einer trypsinähnlichen Protease und einer Exopeptidase vom Carboxypeptidase B Typ unter Verlust des Argininrestes 327 in die infektiöse Form übergeführt wird, in der die zwei Untereinheiten HA₁ (326 Aminosäuren) und HA₂ (222 Aminosäuren) nur noch über eine Disulfidbrücke von Cystein 14 (HA₁) zu Cystein 137 (HA₂) verbunden bleiben. Die Aminosäuresequenz enthält fünf mögliche Glykosylierungsstellen in der HA₁ und zwei in der HA₂ Untereinheit (Winter et al., 1981).

Durch die Akkumulierung von Mutationen oder durch den Austausch von Genen unterliegt die Antigenität der Oberflächenglykoproteine von Influenza A Viren ständigen Veränderungen. Antikörper, die die Infektiosität von Influenzaviren neutralisieren, sind gegen das Hämagglutinin gerichtet. Die antigenetische Variabilität des Hämagglutinins ist hauptsächlich für die immer wieder auftretenden Ausbrüche von Influenza verantwortlich, sowie für die Unmöglichkeit, die Krankheit durch Impfung unter Kontrolle zu bringen. Zwei verschiedene Vorgänge können die Antigenität des Influenza Hämagglutinins verändern:

Das segmentierte Genom der Influenzaviren schafft günstige Voraussetzungen für den Austausch genetischer Information. Dies erfolgt wahrscheinlich durch den Austausch von Gensegmenten (Reassortment) während der Doppelinfektion einer Zelle mit zwei verschiedenen Influenzastämmen (Scholtissek et al., 1977). Dieser Vorgang konnte in vitro imitiert werden (Campbell et al., 1979; Baez et al., 1980) und er scheint auch in der Natur vorzukommen (Desselberger et al., 1978; Bean et al., 1980; Hinshaw et al., 1980; Sriram et al., 1980; Sugimura et al., 1980; Pensaert et al., 1981). Wenn RNA Segmente ausgetauscht werden, die Oberflächenglykoproteine verschiedener Subtypen kodieren, so besitzt die Tochtergeneration neue Hüllantigene, gegen die in der Wirtspopulation keine neutralisierenden Antikörper vorhanden sind.

Die abrupte Änderung der antigenetischen Eigenschaften von Influenzaviren wird als ANTIGENSHIFT bezeichnet. Oberflächenantigene, die verschiedenen Subtypen angehören, zeigen keine serologischen Kreuzreaktionen und die Aminosäuresequenzhomologien liegen zwischen 36 und 80 % (Air, 1981). Da die Wirtspopulation für Influenzaviren mit neuen Oberflächenantigenen voll empfänglich ist, können solche Stämme Epidemien oder Pandemien hervorrufen. Dabei kann der Austausch des Gensegmentes, das das Hämagglutinin kodiert genügen, um einen Influenzastamm von epidemischem oder pandemischem Potential entstehen zu lassen. Ein Beispiel hierfür ist die Pandemie von 1968, deren Erreger sich von den bis dahin zirkulierenden H2N2 Stämmen nur durch das neue H3 Hämagglutinin unterschied (Rott et al., 1985).

Je länger Influenzastämme eines Subtyps in einer Wirtsspezies mit hohem Durchseuchungsgrad, wie z.B. dem Menschen, zirkulieren, desto mehr Mutationen akkumulieren in Antikörperbindungsstellen und desto weiter entfernen sie sich in ihren antigenetischen Eigenschaften vom Ursprungsstamm.

Diesen Vorgang der fortlaufenden Veränderung antigenetischer Merkmale durch Anhäufung von Punktmutationen unter dem Selektionsdruck einer hohen Populationsimmunität bezeichnet man als ANTIGENDRIFT. Serologische Kreuzreaktionen sowie Nukleotid- und Aminosäuresequenzhomologien zwischen den Stämmen eines Subtyps nehmen mit der Zeit ab. Die Aminosäuresequenzhomologien der bekannten Subtypen liegen zwischen 91 und 100 % (Air, 1981). In den vier Antigenorten von H1 Hämagglutininen (Sa, Sb, Ca und Cb) zeichnete sich der Fortgang der Evolution am deutlichsten im Antigenort Ca ab, am wenigsten in Cb. Die relative Bedeutung der vier Genorte für die Antigen drift ist wahrscheinlich unterschiedlich (Raymond et al., 1986).

2.5 Variationsuntersuchungen am Beispiel des Hämagglutinins

Veränderungen im Influenzagenom sind die Grundlage für Variationen der viralen Proteine und ihrer phänotypischen Eigenschaften. Untersuchungen der Variation befassen sich daher entweder mit den genotypischen oder phänotypischen Veränderungen der Gene oder Genprodukte.

2.5.1 Untersuchung phänotypischer Eigenschaften

Der Hämagglutinationsinhibitionstest (HI) ist der älteste Test zur Untersuchung dieses Oberflächenantigens. Er basiert auf der spezifischen Hemmung der (Rezeptor-)Bindung von Influenzaviren an Hühnerythrozyten durch Antikörper, die gegen das Hämagglutinin gerichtet sind. Als Antikörper finden polyklonale Antiseren (Hyperimmunseren oder Postinfektionsseren) oder monoklonale Antikörper Verwendung. Je nach Art des verwendeten Antiserums bzw. Antikörpers ist der Test unterschiedlich sensitiv für den Grad der antigenetischen Abweichung.

2.5.2 Untersuchungen des Genoms

Bei einem Oligonukleotid Mapping (oligonucleotide fingerprint analysis) entstehen nach der sequenzspezifischen Spaltung eines RNA Stranges, z.B. mit T1-RNase, eine bestimmte Anzahl individueller Oligonukleotide, die in einer zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden (de Wachter & Fiers, 1972). Vergleicht man die Positionen der Oligonukleotide mehrerer Stämme, so kann aus Ähnlichkeiten bzw. Unterschieden auf den Grad der Verwandtschaft geschlossen werden, allerdings unter dem Vorbehalt, daß mit dieser Methode nur etwa 10 % des Genoms untersucht werden können (Nakajima et al., 1978; Cox & Kendal, 1984).

Mit Hilfe der Nukleinsäurehybridisierung kann die Basensequenzhomologie zweier Nukleinsäuren summarisch ermittelt werden, indem man z.B. virale RNA mit komplementärer, radioaktiv markierter RNA hybridisiert und den entstehenden Doppelstrang mit S1-Ribonuklease verdaut. Da dieses Enzym nur einzelsträngige RNA hydrolysiert, ist der Grad der Ribonukleaseresistenz des Doppelstranges ein direktes Maß für die Homologie zwischen den beiden Nukleinsäuren (Hay et al., 1977; Ghendon et al., 1981).

Nukleotid- und Aminosäuresequenzanalysen sind Methoden, die exakte Informationen über das Variationsgeschehen vermitteln können. Von klonierten cDNA Kopien des Hämagglutinins wurden mit der Methode der chemischen DNA Spaltung (Maxam & Gilbert, 1977) die ersten Nukleotidsequenzen bestimmt (Porter et al., 1979; Verhoeyen et al., 1980; Winter et al., 1981; Hiti et al., 1981).

Die alternative Methode der direkten RNA Sequenzierung, mit synthetischen Oligonukleotidprimern und reverser Transkriptase in einer Didesoxynukleotid-Kettenabbruchreaktion (Sanger et al., 1977; Air, 1979), bietet demgegenüber den Vorteil, daß sie, sofern geeignete Referenzsequenzen zur Verfügung stehen, in kurzer Zeit den Vergleich mehrerer Hämagglutinine, deren Nukleotidsequenzen nicht zu weit voneinander abweichen sollten, ermöglicht. Sie ist mittlerweile die Methode der Wahl geworden um nahe verwandte Stämme zu studieren, die z.B. durch Antigen-drift auseinander hervorgegangen sind.

Um die Hämagglutinine mehrerer Stämme zu vergleichen wird häufig nur mehr der Teil des RNA Segmentes 4 herangezogen, der die HA₁ Untereinheit des Hämagglutinins kodiert (Skehel et al., 1983; Daniels et al., 1985; Raymond et al., 1986; Stevens et al., 1987). Da alle antigenetischen Determinanten des Proteins in der HA₁ Untereinheit lokalisiert sind, akkumulieren in den entsprechenden Nukleotid- und Aminosäuresequenzen häufiger Mutationen, die den Fortgang der Antigendrift markieren, und die Homologien zwischen den HA₁ Anteilen von Influenzastämmen sind stets niedriger als zwischen ihren HA₂ Anteilen (Tab. 2).

Tabelle 2:

Konservierung von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen zwischen verschiedenen Hämagglutininsubtypen.

Für diesen Vergleich wurden die Stämme A/PR/8/34 (H1), A/Japan/305/57 (H2), A/Aichi/2/68 (H3) und A/FPV/Rostock/34 (H7) herangezogen. Die Homologien der HA₂ Untereinheiten stehen in Klammern neben den Homologien der HA₁ Untereinheiten.

	H1	H2	H3	H7
	% konservierte Aminosäuren ^a			
H1		58(79)	35(53)	33(51)
H2	61(72)		36(50)	35(53)
H3	45(58)	45(57)		36(65)
H7	44(58)	46(59)	45(66)	
	% konservierte Nukleotide ^b			

^aDie Werte der Aminosäuresequenzhomologien sind oberhalb der Diagonale der homologen Werte angegeben

^bDie Werte der Nukleotidsequenzhomologien sind unterhalb der Diagonale der homologen Werte eingetragen.

Aus: Winter et al. (1981)

Die Influenzaviren (Familie Orthomyxoviridae) werden in drei Typen (A, B und C) unterteilt, die sich aufgrund der stabilen, typenspezifischen antigenetischen Eigenschaften ihrer internen Strukturproteine Nukleoprotein (NP) und Matrixprotein (M), in der Komplementbindungsreaktion (KBR) und im Agargelpräzipitationstest (AGPT) unterscheiden. Influenzaviren vom Typ A unterteilt man nach den antigenetischen Eigenschaften ihrer Hüllproteine HA und NA im Hämagglutinationshemmtest, bzw. im Neuraminidasehemmtest weiter in Subtypen.

Bis 1971 wurden neu auftretende Influenza A Virus Subtypen fortlaufend mit A0, A1, A2, A3 benannt. Bei einer Antigen shift müssen aber nicht unbedingt beide Hüllantigene ausgetauscht werden. Daher schlug die WHO eine Klassifizierung vor, in der die beiden Oberflächenantigene für jeden Stamm einer Wirtsspezies getrennt bezeichnet wurden: H0-3 und N1-2 für den Menschen, Hsw1 und Nsw1 für das Schwein, Heq1-2 und Neq1-2 für das Pferd, Hav 1-10 und Nav1-6 für die Vögel (Anonymus, 1971).

Vergleichende serologische Untersuchungen von Hämagglutininen und Neuraminidasen verschiedener Wirtsspezies (Schild et al., 1980), sowie neue Methoden des Genomvergleichs (Scholtissek et al., 1977; Scholtissek, 1978) führten 1980 zu einer nochmaligen Neuklassifizierung (Anonymus, 1979; Anonymus, 1980), die nun auch der Theorie Rechnung trug, daß bei einer Antigen shift möglicherweise Gensegmente zwischen Influenzastämmen verschiedener Wirtsspezies ausgetauscht werden. Die Bezeichnung der Wirtsspezies, von der das Antigen isoliert worden war, entfiel. Die Subtypen H0, H1 und Hsw1 wurden aufgrund ihrer hohen Nukleotidsequenzhomologien in einen Subtyp H1 zusammengefaßt, dessen antigenetische Merkmale dadurch sehr breit gefächert wurden. (Sollen die früheren Untergruppen des Subtyps H1 angesprochen werden, so geschieht das als z.B. H1(Hsw1).) Ebenfalls in einen Subtyp zusammengefaßt wurden Hämagglutinine von Influenzaviren verschiedener Wirtsspezies (H3, Heq2 und Hav7 zum Subtyp H3; Heq1 und Hav1 zum Subtyp H7).

Nach dieser bis heute gültigen Klassifizierung unterscheidet man 13 verschiedene Hämagglutinine und neun Neuraminidasen (Tab. 3).

Der Name jedes Influenzastammes sollte die folgenden Bestandteile enthalten: Bezeichnung des Typs (A, B oder C); die Wirtsspezies, wenn der Stamm nicht vom Menschen isoliert wurde; den geographischen Ort der Isolierung; die laufende Nummer des Stammes am Isolierungsort und das Jahr der Isolierung. In Klammern wird meist noch die HA- und NA-Konfiguration angegeben, also zum Beispiel A/duck/Bavaria/2/77 (H1N1).

Tabelle 3:

Kombinationen von Hämagglutinin- (HA) und Neuraminidasesubtypen (NA), die aus Vögeln und Säugetern isoliert wurden.

In der Tabelle werden verschiedene Symbole verwendet:  für Subtypenkonfigurationen, die außer in Vögeln auch in Säugetierspezies nachgewiesen wurden;  für Subtypenkonfigurationen, die bisher nur aus Vögeln isoliert wurden.

	HA NA													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														

Subtypen die in Säugetierspezies nachgewiesen wurden:

H1N1 : Mensch, Schwein, Wal

H3N8 : Pferd

H1N2 : Schwein

H7N1 : Mensch

H2N2 : Mensch, Schwein

H7N7 : Pferd, Seehund

H3N2 : Mensch, Schwein

H10N4 : Nerz

2.7 Ökologie der Influenzaviren in ihren Wirtsspezies

2.7.1 Mensch

Die ersten gesicherten Aufzeichnungen über Influenzaepidemien stammen aus dem 16. Jahrhundert (Vaughan, 1921; Beveridge, 1977). Möglicherweise beschrieb jedoch bereits Hippokrates 412 v.Chr. eine Influenzaepidemie (Kaplan & Webster, 1977). Seitdem wurde immer wieder von Pandemien und dazwischenliegenden Epidemien berichtet (Stuart-Harris et al., 1985). In Aufzeichnungen einer florentinischen Familie des 16. Jh. wurde der Name "Influenza" in Zusammenhang mit dem typischen Krankheitsbild gebraucht, da die Astrologen kosmische Einflüsse als Ursache für die Epidemie verantwortlich machten (Di Camugliano, 1933). Erst im 19. Jh. wurde in Frankreich die Bezeichnung "la grippe" geprägt.

Tabelle 4:

Vorherrschende Subtypen des Hämagglutinins von Influenzaviren des Menschen.

Zeitraum	Subtyp	Referenzstamm
1889-1901	H2	(Jap/305/57 ähnlich)
1902- 17	H3	(HK/1/68 ähnlich)
1918- 28	H1(Hsw1)	(sw/1976/31 ähnlich)
1929- 43	H1(H0)	PR/8/34
1946- 47	H1(H1)	FM/1/47
1957- 68	H2	Jap/305/57
1968-	H3	HK/1/68
1976-	H1(Hsw1)	NJ/8/76
1977-	H1(H1)	USSR/50/77

Nach: Davenport (1977)

Mit der Isolierung humaner Influenzaviren (Smith et al., 1933) und der Entdeckung der Hämagglutinationshemmungsreaktion als Methode, um unbekannte Serumantikörper mit bekannten Virusantigenen zu charakterisieren (Hirst, 1941, 1942), waren die Voraussetzungen geschaffen, um retrospektive Studien mit Rekonvaleszentenseren zu unternehmen. Es zeigte sich, daß Subtypen, die bereits früher im Menschen zirkuliert waren, Jahre später erneut Epidemien verursachten (Davenport et al., 1969; Masurel, 1969; Davenport, 1977).

Obwohl das Vorkommen weiterer Subtypen beim Menschen nicht letztlich ausgeschlossen werden kann, scheinen hauptsächlich die drei bekannten Hämagglutinine H1, H2 und H3 im Menschen zu zirkulieren. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die seit 1889 im Menschen vorherrschenden Influenzasubtypen.



Abbildung 6: Modelldarstellung der Evolution von Influenza Viren der Typen A, B und C im Menschen.

Punkte in einer horizontalen Linie stellen Varianten dar, die gleichzeitig zirkulieren. Bei den Influenza A Viren entstammen die Varianten eines Jahres einer Variante des Vorjahres. Bei den Influenza B und C Viren zirkulieren dagegen gleichzeitig Stämme mehrerer Evolutionslinien.

Nach: Yamashita et al. (1988)

Die Erstellung von Stammbäumen mit Hilfe von Nukleotidsequenzdaten hat sich als wertvolles Mittel erwiesen, um unklare epidemiologische Befunde zu durchleuchten, die dann z.B. als Verzweigungen, Anachronismen oder zwischenartliche Übertragungen sichtbar werden können.

Aus einer großen Anzahl von Nukleotidsequenzen konnte ein Modell der Evolution von Influenzavirus Hämagglutininen im Menschen erstellt werden (Yamashita et al., 1988). Die Influenza A Viren einer Saison entwickeln sich meist aus einer einzigen Variante des vorhergehenden Jahrgangs. Dadurch verläuft die Entwicklung der Influenza A Viren im Prinzip linear, da aus einer Generation von Influenzaviren meist nur eine Variante genügend Selektionsvorteile besitzt, um sich durchsetzen zu können (Abb. 6). Die Anzahl von Austauschen zwischen zwei Influenza A Stämmen ist deshalb proportional zu den zeitlichen Abständen, in denen die Stämme isoliert wurden. Von Influenza B und C Viren zirkulieren dagegen mehrere Evolutionslinien gleichzeitig und nahe verwandte Stämme wurden oft in erheblichen Zeitabständen isoliert (Buonagurio et al., 1985).

Die Geschichte der H1N1 Influenzaviren in unserem Jahrhundert beginnt mit der Pandemie von 1918/19, der "Spanischen Grippe" (Vaughan, 1921). Schnurrenberger et al. (1970) zeigten rückblickend anhand serologischer Daten, daß das kausative Agens H1(Hsw1) Influenzaviren waren. Das älteste Isolat vom Subtyp H1(H0), der Stamm WS/33 (Smith et al., 1933) ist zugleich das erste Influenzavirus, das vom Menschen isoliert wurde. Bis 1943 zirkulierten ähnliche Influenzastämme, doch nach 1946 isolierte Stämme trugen Hämagglutinine, die mit den bis dahin zirkulierenden keine serologische Kreuzreaktion zeigten. Die neuen Stämme wurden als H1(H1) klassifiziert. 1957 lösten nach einer Antigen shift H2N2 Stämme den H1N1 Subtyp ab, doch 19 Jahre später verursachte erneut ein H1(Hsw1) Influenzavirus (Kendal et al., 1977a) eine Epidemie unter Rekruten von Fort Dix, New Jersey (Top & Russell, 1977).

1977 wurde während einer Epidemie in der USSR ein H1(H1) Virusstamm (A/USSR/90/77) isoliert, der einem Stamm von 1950 (A/FW/1/50) auffällig ähnlich war (Nakajima et al., 1978; Scholtissek et al., 1978).

Raymond et al. (1986) konnten nachweisen, daß die H1 Hämagglutinine 1950 und 1977 tatsächlich von nahezu identischen Varianten (FW/50 und USSR/90/77) ausgingen, aber verschiedene Evolutionswege eingeschlagen haben (Abb. 7).

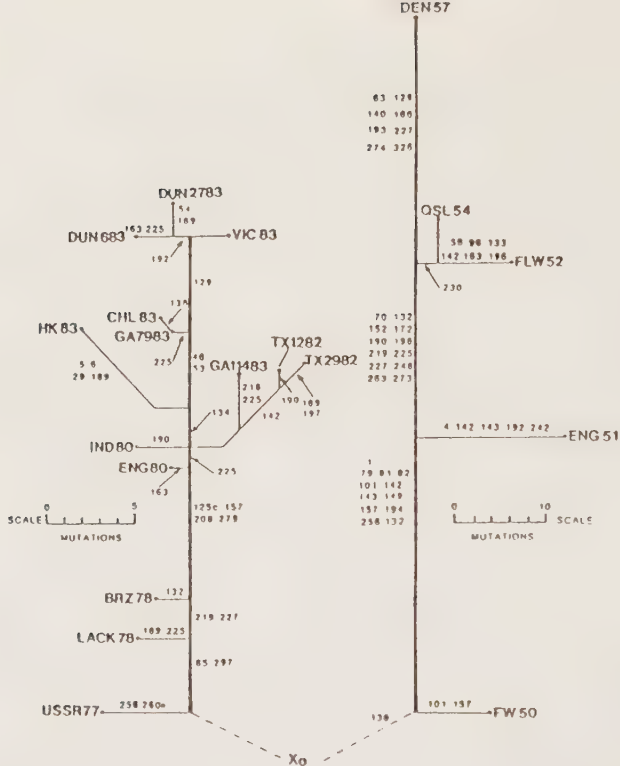


Abbildung 7: Divergierende Evolutionswege der Hämagglutinine von Influenzastämmen (H1N1) in den Jahren 1950-57 und 1977-83.

Die Ziffern beziehen sich auf Aminosäuren, die als "Hauptmutationen" in allen folgenden Stämmen konserviert sind (senkrechte Linie), oder auf "Nebenmutationen", die stammspezifisch sind (waagrechte und schräge Linien). Nummern die zweimal erscheinen sind entweder unabhängige Austausche (z.B. 163) oder Folgemutationen (z.B. 225). Xo bezieht sich auf ein gemeinsames unbekanntes Vorläuferprotein.

Aus: Raymond et al. (1986)

Bis heute ist ungeklärt, wo der Stamm USSR/90/77 sich zwischen 1950 und 1977 in praktisch unveränderter Form erhalten konnte. Es wurde diskutiert, daß das Virus in gefrorenem Zustand, oder in einem menschlichen

oder animalischen Reservoir konserviert war (Nakajima et al., 1978). Seit 1977 sind H1N1 Stämme in der ganzen Welt wieder kontinuierlich präsent.

Der Stammbaum der H1 Hämagglutinine besitzt durch seine Aufzweigung in mehrere große Evolutionslinien ungewöhnliche Plastizität: 1918 wurden vermutlich Mensch und Schwein vom gleichen Virus infiziert. Die Evolution im Schwein hat die Antigenität dieser Influenzaviren kaum verändert (Meier-Ewert et al., 1970), während ihre antigenetischen Eigenschaften durch Passagen im Menschen eine intensive Wandelung durchgemacht haben. 1950-57 und 1977-1988 ist der Subtyp, ausgehend von beinahe identischen Varianten (FW/50 und USSR/90/77), zwei verschiedenen Evolutionslinien gefolgt (Raymond et al., 1986).

Neben den großen Evolutionslinien treten, wenn auch selten, immer wieder "anachronistische" Influenzastämme auf. Sie gleichen älteren Varianten, die seit Jahren nicht mehr zirkulierten. 1949 war während einer Epidemie unter kanadischen Eskimos ein PR/8/34 (H1(H0)) ähnliches Virus isoliert worden, obwohl in allen Ländern der Welt bereits seit 1946 Epidemien von FM/1/47 (H1(H1)) ähnlichen Stämmen verursacht wurden (van Rooyen et al., 1949), und 1968 wurde in Deutschland ein H1N1 Virus isoliert, das serologische Ähnlichkeit mit FM/1/47 zeigte (Moore et al., 1981). 1978 wurden in Japan von Patienten H1N1 Stämme isoliert, die sich antigenetisch und genetisch wie Stämme von 1953 verhielten (Nakajima et al., 1979). Diese Hinweise, daß Influenzaviren, die bereits früher im Menschen zirkulierten, wieder auftauchen können, erhielten 1976 durch den "Fort Dix incident" und 1977 durch das Wiederauftreten von FW/50, kaum verändert als USSR/90/77 unterstützende Beweise (Kendal et al., 1978; Nakajima et al., 1978).

Im Stammbaum von 1977 an findet man mehrere Aufzweigungen. Meist sind das "anachronistische" Stämme, deren Pendant einige Jahre früher zirkulierten, oder Varianten, die zu keiner weiteren epidemiologischen Bedeutung gelangt sind (möglicherweise erfaßt heute ein dichteres Netz der Influenzaüberwachung häufiger Varianten, die keine entscheidenden Selektionsvorteile besitzen).

1918 beobachtete Koen (1919) im Norden der USA erstmals eine grippeähnliche Erkrankung bei Schweinen, deren Erreger, ein Influenzavirus vom Subtyp H1N1, von Shope (1931a,b) isoliert wurde. Seit dem ersten Auftreten kommen jährlich Ausbrüche von Schweineinfluenza im Norden und Mittelwesten der Vereinigten Staaten vor (Dorset, 1922; McBride, 1927; Easterday, 1975). Die antigenetischen Eigenschaften der Schweineinfluenzaviren aus den USA blieben seit 1930 außerordentlich stabil (Meier-Ewert et al., 1970). Dennoch sind inzwischen Isolate jüngeren Datums gut von den früheren Stämmen abzugrenzen (Easterday, 1981; Hinshaw et al., 1978b).

Schweine können, nachdem sie eine Influenzainfektion durchgemacht haben, persistierend infiziert bleiben. Die durchwegs höheren Antikörpertiter in Zuchttieren können dabei von einer fortdauernden Stimulierung des Immunsystems durch persistierende Influenzaviren herrühren (Nakamura et al., 1972). Blaskovic et al. (1970) beobachteten, daß ein experimentell infiziertes Tier vier Monate lang Schweineinfluenzaviren ausschied.

In Europa wurden 1938 in Nordirland (Lamont, 1938), 1939 in Großbritannien (Blakemore & Gledhill, 1941; Blakemore et al., 1941) und 1950 in der Tschechoslowakei (Harnach et al., 1950) Schweineinfluenzavirusstämme isoliert. Nach diesen Ausbrüchen gab es in Europa lange Zeit keine Anzeichen für das Vorkommen von Schweineinfluenza. Erst 1976 wurden in Italien erneut Krankheitsfälle beobachtet (Nardelli et al., 1978). Die beiden Isolate A/swine/Nordirland/38 und A/swine/Cambridge/39 sind antigenetisch voneinander, und von der Gruppe der Schweineinfluenzastämme aus den USA verschieden (Gompels, 1953; Jensen & Peterson, 1957; Meier-Ewert et al., 1970). Im Hämagglutinationsinhibitionstest mit Frettchenpostinfektionsseren zeigten sie Kreuzreaktionen mit humanen H1 Stämmen (Gompels, 1953). Auch in Untersuchungen der jüngeren Zeit wurde sw/Cam/39 immer wieder als antigenetisch verschieden von anderen Schweineinfluenzaviren beschrieben (Kendal et al., 1977b; Pensaert et al., 1981; Hinshaw et al., 1984).

1979 trat in Deutschland eine nicht enzootische Variante des Subtyps H1(Hsw1) auf, die die klinischen Erscheinungen einer epizootischen Atem-

wegserkrankung hervorrief (Witte et al., 1981; Ottis et al., 1981) und gegen die in Seren vor 1979 keine Antikörper enthalten waren (Witte et al., 1981). In Belgien und Frankreich waren kurz zuvor ähnliche Stämme isoliert worden (Vandeputte et al., 1980; Gorreau et al., 1980). Dort war diese Variante des Subtyps H1(Hsw1) aber enzootisch und ging nicht obligatorisch mit einer klinisch apparenten Erkrankung einher (Scholtissek et al., 1983). Die serologischen Eigenschaften der Hämagglutinine dieser Stämme entsprechen eher aviären Isolaten, als klassischen H1(Hsw1) Isolaten vom Schwein (Pensaert et al., 1981; Hinshaw et al., 1984).

Zur Zeit der Hong Kong Pandemie (1968) wurden zum ersten Mal H3N2 Stämme von Schweinen isoliert, die keine Symptome einer klinischen Erkrankung gezeigt hatten (Kundin, 1970). Die meisten der seitdem von Schweinen isolierten H3N2 Influenzaviren reflektieren die im Menschen ablaufende Antigendrift (Kundin, 1970; Hinshaw et al., 1978b; Shortridge et al., 1979; Tumova et al., 1985). Eine eigenständige Drift der H3N2 Influenzastämme in der Wirtsspezies Schwein wurde bisher nicht beobachtet (Tumova et al., 1985). Daneben bleiben in Schweinen Varianten humaner H3N2 Stämme erhalten, die im Menschen seit Jahren nicht mehr in Umlauf sind (Shortridge et al., 1976, 1979, 1987; Nakajima et al., 1982). Kida et al. (1988) konnten zeigen, daß eine Gruppe von H3 Hämagglutininen, die in einer geographisch begrenzten Region von Schweinen isoliert worden sind und alten humanen H3 Stämmen ähneln, mit großer Wahrscheinlichkeit in Enten konserviert waren und auf Schweine übertragen worden sind.

2.7.3 Hinweise auf zwischenartliche Übertragungen von H1N1 Influenzaviren

H1N1 Influenzaviren wurden aus Vögeln, Menschen und Schweinen isoliert. In jedem dieser Wirte folgen die H1 Influenzastämme eigenen ökologischen Gesetzen, d.h. es handelt sich nicht um Abklatschisolate, wie dies für H3 Hämagglutinine, die vom Schwein isoliert werden der Fall zu sein scheint (Hinshaw et al., 1978b; Shortridge et al., 1979; Tumova et al., 1985). Eine Zeittafel wichtiger H1N1 Stämme ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5:

Zeittafel epidemiologisch wichtiger H1N1 Stämme aus Europa und den USA.

	Mensch	Schwein (USA)	Schwein (Europa)	Enten
1918/19	(Hsw1)	(Hsw1)		
1930		sw/shope/15/30		
1933	WS/33			
1934	PR/8/34			
1938			sw/NIr1/38	
1939			sw/Cam/39	
1946	CAM/46			
1947	FM/1/47			
1950	FW/1/50			
1957	DEN/1/57			
1976	Wis/263/76 Wis/301/76 NJ/8/76	sw/Wis/56/76 sw/Wis/11/76	sw/Ita/76	dk/Alb/35/76
1977	USSR/90/77			dk/Bav/2/77
1979			sw/Bel/1/79	
1981			sw/Ger/2/81	

Studien mit Rekonvaleszentenseren haben gezeigt, daß der Erreger der "Spanischen Grippe" (1918/19) ein Influenzavirus war, dessen Hämagglutinin mit dem Hämagglutinin von Schweineinfluenzaviren identisch oder zumindest sehr nahe verwandt war (Andrewes et al., 1935; Shope, 1936; Schnurrenberger et al., 1970).

Nakajima et al. (1984) schlossen aus einem Vergleich der Nukleotidsequenzen der RNA Segmente, die die Matrix- und Nichtstrukturproteine von A/PR/8/34 und A/swine/Iowa/15/30 kodieren, daß, vorausgesetzt diese stammen von gleichen Vorfahren, das "Ahnenvirus" etwa 1915-1920 im Umlauf gewesen sein muß.

Da die Stämme seit 1918 in Menschen und in Schweinen eine eigenständige Drift durchmachten und die ersten Schweine-, bzw. humanen Influenzastämme erst 1930, bzw. 1933 isoliert wurden, wird vielleicht ungeklärt bleiben, in welcher Richtung diese Influenzaviren die Speziesbarriere überschritten haben.

1976 wurde in den USA von Schweinen und von Menschen, die Kontakt mit Schweinen hatten, Influenzastämme vom Subtyp H1(Hsw1) isoliert. Die Verteilungsmuster der RNA Segmente der Isolate A/Wisconsin/263/76 und A/swine/Wisconsin/56/76, die auf einer Farm isoliert worden waren, waren identisch (Hinshaw et al., 1978b). Dies war umso überraschender, als zwischen den Mustern der RNA Segmente aller anderen Isolate Unterschiede zu entdecken waren. Die Stämme sind serologisch eindeutig den zeitgenössischen Schweineinfluenzaviren H1(Hsw1) zuzuordnen und wurden vermutlich von Schweinen auf Menschen übertragen (Hinshaw et al., 1978b). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch wurde nicht beobachtet (Hinshaw et al., 1978b).

Im gleichen Jahr aber verursachte ein ähnliches H1(Hsw1) Influenza A Virus eine Epidemie unter Rekruten von Fort Dix (Smith et al., 1976a,b; Kendal et al., 1977a). Man befürchtete eine Pandemie von verheerendem Ausmaß, da auch die Erreger der "Spanischen Grippe" dem Subtyp H1(Hsw1) angehört hatten. Der Ausbruch blieb jedoch auf 500 Krankheitsfälle begrenzt und die New Jersey Stämme erreichten nie die befürchtete epidemiologische Bedeutung (Kaplan & Webster, 1977). Da in Schweinen bereits in den Jahren vorher nahezu identische Stämme vorgekommen waren (Kendal

et al., 1977b; Hinshaw et al., 1978b), nimmt man an, daß auch dieses Virus von Schweinen auf den Menschen übertragen worden ist (Kendal et al., 1977b).

Hinweise auf die Übertragung von H1N1 Influenzaviren von Mensch zu Schwein sind selten.

Antikörpertiter in Schweineseren gegen humane H1N1 Influenzaviren (Shope, 1938; Arikawa et al., 1979; Tumova et al., 1980, 1985; Nerome et al., 1982; Shortridge & Stuart-Harris, 1982) lassen zwar den Schluß zu, daß H1N1 Influenzaviren von Mensch zu Schwein übertragen werden, aber bisher wurde nicht beobachtet, daß Ausbrüche von Schweineinfluenza von humanen H1N1 Influenzaviren verursacht werden. Das bisher einzige H1N1 Influenzavirus, das vermutlich vom Menschen auf Schweine übertragen worden ist, stammt von einem Tier, das keine Anzeichen einer klinischen Erkrankung gezeigt hatte. Nerome et al. (1982) zeigten, daß das Isolat A/swine/Bangkok/32/79 (H1N1) in seinem serologischen Verhalten und seinem Oligonukleotid-Fingerprint Muster die größte Übereinstimmung mit kurz zuvor in Thailand isolierten humanen Stämmen (z.B. A/Bangkok/3/79 (H1N1)) zeigte.

Seit 1976 wurden mehrmals H1(Hsw1) Influenzaviren von Enten isoliert (Butterfield et al., 1978; Hinshaw et al., 1978a; Ottis & Bachmann, 1980; Arikawa et al., 1983). Die Hämagglutinine der europäischen Schweineinfluenzaviren, die ab 1979 isoliert wurden, stehen serologisch diesen aviären Isolaten (A/duck/Alberta/35/76, A/duck/Bavaria/2/77) näher, als porcinen Stämmen (Pensaert et al., 1981; Hinshaw et al., 1984). Pensaert et al. (1981) vermuteten daher, daß diese Stämme oder ihre Hämagglutinine aviären Ursprungs sind. In einer DNA-RNA Hybridisierung ergab sich sinngemäß eine Nukleotidsequenzhomologie von höchstens 72 % mit dem Hämagglutinin eines klassischen Schweineinfluenzavirus (A/swine/1976/31), aber Homologien von mehr als 91 % mit den oben genannten Enteninfluenzastämmen (Scholtissek et al., 1983).

Eine Influenzaerkrankung bei Pferden wurde bereits 1695 von Molineux beschrieben, der gleichzeitig die Vermutung äußerte, daß möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Influenza von Pferden und Menschen bestünde (Davenport, 1977). Das zeitliche Zusammentreffen von equiner und humaner Influenza zwischen 1688 und 1890 erwähnt auch Thompson (1890). Der erste Influenzastamm vom Pferd ist das Isolat A/equi/Prag/56 (H7N7). Stämme eines zweiten Subtyps (A/equi/Miami/63 (H3N8)) wurden ab 1963 isoliert; diese nahmen den Subtyp H3 voraus, der 5 Jahre später im Menschen eine Pandemie auslösen sollte (Chang, 1969).

1979-80 starben 20 % der Robbenpopulation der Cap Cod Bay, Massachusetts an einer respiratorischen Infektion, die durch ein Influenza A Virus (H7N7) verursacht worden war (Webster et al., 1981; Geraci et al., 1982). Der Subtyp war noch nie in Säugern beobachtet worden und ist mit Influenza A/FPV/Dutch/27, einem hochpathogenen Stamm der klassischen Geflügelpest nahe verwandt. Ähnliches ereignete sich noch einmal 1981-82 in der gleichen Robbenpopulation. Diesmal war das kausative Agens ein Influenza A Virus vom Subtyp H4N5 (Stuart-Harris et al., 1985). Aus Walen wurden Influenzaviren des Subtyps H1N1 (Lvov et al., 1978) isoliert. Influenzaviren des Subtyps H10N7 wurden in Nerzen nachgewiesen.

Das erste Influenzavirus wurde 1927 aus Vögeln isoliert (Stubbs, 1965). Es handelte sich um das Virus der klassischen Geflügelpest A/FPV/Dutch/27 (H7N7). Allerdings erkannte erst Schäfer (1955), daß es sich bei diesem Erreger um ein Influenzavirus handelte.

Die Ökologie der Influenzaviren unterliegt in Vögeln grundsätzlich anderen Gesetzmäßigkeiten als in Säugern. Influenzaviren vermehren sich im Intestinaltrakt und in der Bursa fabricii der Vögel (Webster et al., 1978; Naeve et al., 1984) und werden in nicht infektiöser Form, d.h. mit ungespaltenem Hämagglutinin bis zu 30 Tage post infectionem mit dem Kot ausgeschieden. In Seewasser besitzen Influenzaviren mit ungespaltenem Hämagglutinin eine hohe Tenazität und bleiben bei 0°C etwa 30 Tage vermehrungsfähig (Webster et al., 1978).

Aus dem Seewasser infizieren sich weitere Vögel peroral. In nicht infektiöser Form passiert das Virus den saueren pH-Wert des Magens. Diese Infektionsroute ist für Influenzaviren von Säugern nicht möglich, denn nur die aviären Influenzaviren tolerieren pH-Werte bis 4.0 ohne ihre Infektiosität einzubüßen (Webster et al., 1978). Im Darmtrakt spalten Verdauungsenzyme das Hämagglutinin in seine Untereinheiten HA₁ und HA₂, worauf sich das nunmehr infektiöse Virus im Intestinaltrakt und der Bursa fabricii vermehren kann. Influenzaviren wurden bereits direkt aus Seewasser isoliert (Hinshaw et al., 1979b), was auf eine große Anzahl von Viruspartikeln und eine hohe Infektionswahrscheinlichkeit für die im Wasser lebenden Vögel schließen läßt.

Seewasser, in dem Vögel sich aufhalten, enthält eine Mischung aller zirkulierenden Influenza A Subtypen und Subtypenkombinationen, mit denen sich im Wasser lebende Vögel peroral infizieren können. Unter diesen Voraussetzungen können Doppelinfektionen eines Individuums mit verschiedenen Influenzastämmen und Rekombinationen sehr leicht vorkommen (Hinshaw et al., 1980).

Während aus Säugetieren nie mehr als drei verschiedene Hämagglutinin- und zwei Neuraminidasesubtypen von einer Spezies isoliert wurden, kennt man bereits 13 aviäre Hämagglutinine und 9 aviäre Neuraminidasen, darun-

ter alle bekannten Subtypen aus Mammalierspezies (Hinshaw et al., 1979a, 1982).

Hinshaw et al. (1978a) fanden, daß in Zugvögeln Hämagglutinine und Neuraminidasen aller bekannten Subtypen in verschiedensten Kombinationen kozirkulieren. Inzwischen konnte gezeigt werden, daß mehrere Evolutionslinien einzelner Gene in Vögeln nebeneinander vorkommen (Sriram et al., 1980; Nakajima et al., 1987; Kida et al., 1987) und daß z.B. H3 Hämagglutinine, die im Menschen 1968 zirkulierten, heute noch mit wenig veränderter Aminosäuresequenz aus Vögeln isoliert werden können (Kida et al., 1987).

Die Vielzahl der Subtypen aviärer Oberflächenantigene, mit denen der Mensch oder andere Säugerspezies noch nie in Berührung waren, stellen eine potentielle Gefährdung dar, doch sind wahrscheinlich nicht alle Antigene mit anderen Wirtsspezies kompatibel (für den Menschen evt. nur H1, H2 und H3).

Die direkte Übertragung von Influenzastämmen zwischen Menschen und Vögeln scheint nicht möglich zu sein, denn die Strukturproteine M und NP sind speziesspezifisch (Bean, 1984; Scholtissek et al., 1985; Buckler-White & Murphy, 1986; Geisler et al., 1986). Deshalb werden Schweine, weil sie für humane und aviäre Influenzaviren empfänglich sind (Hinshaw et al., 1981; Ottis & Bachmann, 1980), als der Zwischenwirt diskutiert, in dem aviäre Stämme sich so verändern, daß sie schließlich auf den Menschen übertragen werden können, oder als der gemeinsame Wirt, in dem ein Reassortment zwischen humanen und aviären oder porcinen Stämmen stattfinden kann (Scholtissek et al., 1985).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Virusvermehrung im embryonierten Hühnerbrutei

10-11 Tage alte, horizontal vorbebrütete Hühnereier werden mit einer Schierlampe durchleuchtet, um unbefruchtete oder abgestorbene Eier auszusondern.

Die Kalkschale wird mit einer Schleifscheibe soweit abgetragen, daß die darunterliegende Eihaut sichtbar wird. Die entstandene Öffnung wird mit geschmolzenem Paraffin bedeckt. 2-3 Tropfen des vorbereiteten Inokulums werden auf das Paraffin getropft, dieses mit einer sterilen Impfnadel durchstoßen, um dem Inokulum Zugang zur Allantoishöhle zu schaffen, und wiederum mit Paraffin verschlossen. Als Inokulum dient virushaltige allantoische Flüssigkeit in einer Verdünnung von 10^{-4} in Saline.

Die beimpften Eier werden, mit dem stumpfen Pol nach oben, weitere drei Tage bei 37°C inkubiert. Eine Vorkühlung von 16 Std. bei 4°C oder 2 Std. auf Eis adstringiert die Blutgefäße und erleichtert eine unblutige Ernte der allantoischen Flüssigkeit. Dazu wird das Ei am stumpfen Pol geöffnet und die allantoische Flüssigkeit mit einer sterilen Kapillare abgesaugt.

3.1.2 Herstellung und Lagerung von Virusstämmen

Frisch geerntete allantoische Flüssigkeit wird durch Zentrifugation 20 Min. bei 1500 x g von Erythrozyten und zellulärem Material befreit. Virus suspensionen mit einem höheren Hämagglutinationstiter als 1:64 werden gepoolt und in Portionen von 2-4 ml bei -70°C eingefroren.

3.1.3 Antigene und Antiseren

Abkürzungen, die im Text für einzelne Stämme verwendet werden, sind in Klammern hinter der Stammbezeichnung vermerkt.

Influenza A Virusstämme:

A/swine/29/37 (sw/29/37), A/swine/shope/54 (sw/shope/54),
A/swine/MAY/54 (sw/MAY/54), A/swine/Nordirland/38 (sw/NIrl/38),
A/swine/Cambridge/39 (sw/Cam/39), A/WSN/33 (WSN/33), A/FM/1/47
(FM/47), A/New Jersey/8/76 (NJ/8/76).

Hyperimmunseren:

A/swine/Iowa/15/30^b (sw/Ia/15/30), A/swine/29/37^a (sw/29/37),
A/swine/Nordirland/38^a (sw/NIrl/38), A/swine/Cambridge/39^{a,b}
(sw/Cam/39), A/swine/shope/54^a (sw/shope/54), A/WSN/33^a (WSN/33),
A/PR/8/34^a (PR/8/34), A/CAM/1/46^a (CAM/46), A/FM/1/47^a (FM/47),
A/New Jersey/8/76^b (NJ/8/76), A/USSR/90/77^b (USSR/77).
A/Brazil/11/78^b (Brazil/78).

^aKaninchenhyperimmunserum

^bFrettchenhyperimmunserum

Die Frettchenhyperimmunseren wurden von Herrn Dr. Eichhorn, Tierklinik der LMU München, die Kaninchenhyperimmunseren gegen die Stämme PR/8/34 und FM/1/47 von Herrn Dr. A. Douglas, London, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Monoklonale Antikörper:

A/PR/8/34: H12, H15, H42, H62, H132, H187, H198, H201, H221,
H280, H308
A/FM/1/47: H6, H13, H92, H131, H258, H290
A/Brazil/11/78: H2, H22, H29, H142, H170

Die monoklonalen Antikörper wurden von Herrn Dr. A. Douglas, London, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.1.4 Hämagglutinationstest

Influenzaviren besitzen die Eigenschaft, Hühnererythrozyten zu agglutinieren. Durch Virus vernetzte Erythrozyten bleiben gleichmäßig in der Vertiefung einer Mikrotiterplatte verteilt. Nicht agglutinierte Erythrozyten sedimentieren und bilden im Zentrum des konkaven Bodens der Vertiefung einen scharf begrenzten Punkt.

Lösungen:

Phosphate buffered saline (PBS)

[150 mM NaCl, 2 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 8 mM Na_2HPO_4 , pH 7.2]

8.76 g NaCl

0.276 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

1.424 g Na_2HPO_4

ad 1000 ml Aqua bidest

Testdurchführung:

In eine Mikrotiterplatte werden in die erste Vertiefung einer Reihe 50 µl einer virushaltigen Lösung pipettiert. Nach Vorlage von je 25 µl Saline in die restlichen Vertiefungen der Reihe, wird mit Hilfe eines Diluters eine Verdünnungsreihe in 2-er Potenzen hergestellt. Zum Nachweis der Hämagglutination dienen pro Vertiefung 25 µl einer 1 %igen Hühnererythrozytensuspension in PBS, die durch Schütteln gleichmäßig mit der Virussuspension gemischt werden. Nach 30 Min. wird der Hämagglutinationstiter abgelesen.

Als Titer gibt man die höchste Virusverdünnung an, die die Erythrozyten noch vollständig agglutiniert. Eine hämagglutinierende Einheit (HAU) ist die Virusmenge, die im Hämagglutinationstest eine 50 %ige Agglutination der Hühnererythrozyten bewirkt.

Einstellung von 4 hämagglutinierenden Einheiten (HAU):

Dem Hämagglutinationstiter einer Virussuspension entsprechend wird in PBS eine Verdünnung hergestellt, die in 25 µl 4-8 hämagglutinierende Einheiten (HAU) enthält.

3.1.5 Hämagglutinationsinhibitionstest

Befinden sich in einem Serum spezifische Antikörper, so inhibieren sie die Fähigkeit der Influenzaviren, Erythrozyten zu agglutinieren. Diese können ungehindert sedimentieren und bilden am Boden der Mikrotiterplatte einen kleinen, scharf begrenzten Knopf. In manchen Seren sind unspezifische Inhibitoren enthalten, die einen spezifischen Antikörpertiter vortäuschen. Diese können durch eine Vorbehandlung der Seren mit rezeptorzerstörendem Enzym (RDE) eliminiert werden.

RDE-Behandlung:

Rezeptorzerstörendes Enzym (RDE) (V. Cholerae, Strain 4Z, WHO Coll.
Center Atlanta, Georgia, USA)

Lösungen:

Calzium-Saline-Lösung

1	g	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
9	g	NaCl
1.203	g	H_3BO_3 (Borsäure)
0.052	g	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
ad 1000	ml	Aqua bidest

0.1 ml Serum wird zusammen mit 0.4 ml RDE-Gebrauchsverdünnung (1:20 verdünnt in Calzium-Saline) 16-18 Std. in einem 37°C Wasserbad inkubiert. Eine weitere Inkubation für 30 Min. bei 56°C erfolgt nach der Zugabe von 0.3 ml einer 2.5 %igen Na-Citrat Lösung und 0.2 ml PBS, pH 7.2. Es ergibt sich eine Endverdünnung des Serums von 1:10.

Testdurchführung:

In die erste Vertiefung einer Reihe einer Mikrotiterplatte werden 50 µl des zu testenden Serums pipettiert. Nach Vorlage von je 25 µl PBS in die restlichen Vertiefungen der Reihe wird eine Verdünnungsreihe in 2-er Potenzen hergestellt. Zu jeder Vertiefung gibt man eine standardisierte Menge Virusantigen (4 HAU/25 µl). Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei Raumtemperatur werden in jede Vertiefung 25 µl einer 1 %igen Hühner-

erythrozytensuspension pipettiert und durch Schütteln gleichmäßig verteilt. Nach 30 Min. kann der HI-Titer abgelesen werden. Alle Inkubationen werden in einer feuchten Kammer durchgeführt, um eine Volumenverkleinerung des Testansatzes zu vermeiden. Bei jedem Hämagglutinationsinhibitionstest wird eine Rücktitrierung der Antigenverdünnung (4 HAU/25 µl) mitgeführt.

Als Antikörpertiter wird die Serumverdünnung angegeben, bei der noch eine mindestens 50 %ige Inhibition des Virusantigens abzulesen ist. Als positive Reaktion werden nur sedimentierte Erythrozyten gewertet, die bei schräggehaltener Platte Fließbewegung zeigen.

Jeder Test wurde mindestens einmal wiederholt.

3.1.6 Virusreinigung

Lösungen:

SET-Puffer

[150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,4]

8.76 g NaCl

1.21 g Tris-HCl, pH 7,4

0.74 g EDTA

(0.8 g NaN₃)

ad 1000 ml Aqua bidest

15 % Saccharose (w/v) in SET, 0.08% NaN₃

60 % Saccharose (w/v) in SET, 0.08% NaN₃

Rotoren:

TFA 20 (Festwinkelrotor), TST 28 und TST 41 (Ausschwingrotoren), Fa. Kontron.

Durchführung:

Durch niedertourige Zentrifugation von Zelltrümmern gereinigte allantoische Flüssigkeit wird in einem Festwinkelrotor (TFA 20) 2 Std. bei 18000 UpM (35000 x g) zentrifugiert. Die virushaltigen Pellets werden in SET-Puffer, 0.08 % NaN₃ resuspendiert und auf einen linearen,

15-60 %igen (w/v) Saccharosegradienten aufgetragen. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgt bei 5°C im TST 28 Rotor, 2 Std. bei 25000 UpM (80000 x g) oder im TST 41 Rotor, 1.5 Stunden bei 35000 UpM (100000 x g) in der Ultrazentrifuge (Fa. Kontron).

Die etwa in der Mitte des durchsichtigen Zentrifugenröhrchen sichtbare, opaleszierende Virusbande wird vorsichtig mit einer Kapillare abgezogen, in SET-Puffer, 0.08% NaN₃ etwa im Verhältnis 1:10 verdünnt und im TST 41 Rotor 1 Std. bei 35000 UpM (100000 x g) pelletiert. Die gereinigten Viren werden bei 4°C in SET-Puffer, 0.08 % NaN₃ gelagert.

3.1.7 RNA-Extraktion

Lösungen:

Phenol

Redestilliertes Phenol wird im Wasserbad bei 68°C geschmolzen und mehrere Male mit SET-Puffer extrahiert. Ein Zusatz von 0.1 % 8-Hydroxychinolin wirkt als Antioxidans und RNase Inhibitor. Die Lösung kann mit SET-Puffer überschichtet bei 4°C bis zu einem Monat aufbewahrt werden.

Chloroform/Isoamylalkohol

Eine Mischung von Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) wird mit SET-Puffer äquilibriert. Die Aufbewahrung ist bei Raumtemperatur möglich.

Durchführung:

In einem sterilen Reaktionsgefäß werden 200 µl Virussuspension in SET-Puffer, 0.08 % NaN₃ mit 10 µl Proteinase K (Fa. Merck; 20 mg/ml in SET-Puffer) und 4 µl 10% SDS versetzt, und 30 Min. bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 6 µl 10 % SDS und 200 µl Phenol folgt eine weitere Inkubation von 5 Min. bei 56°C, während der der Inhalt des Reaktionsgefäßes mehrere Male auf einem Vortexmixer geschüttelt wird. Die Mischung wird mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, 20 Min. bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (Fa. Eppendorf) gemischt und anschließend 5 Min. bei 13000 Upm in einer Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf) getrennt. Die RNA-haltige wässrige Phase wird in ein frisches, steriles Reaktionsgefäß

übertragen und einmal mit 200 µl Phenol und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol, anschließend zweimal mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol reextrahiert. Zur Fällung der RNA wird nach der zweiten Chloroformextraktion die wässrige Phase mit 100 µl 7.5 M NH_4 -Azetat und 750 µl absolutem Äthanol versetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 16 Std. bei -20°C oder 1 Std. bei -70°C kann die RNA durch eine 30-minütige Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge (Fa. Eppendorf) bei 13000 UpM und 4°C pelletiert werden. Das Präzipitat wird zweimal mit jeweils 500 µl 80 %igem Äthanol gewaschen und in 200 µl sterilem Aqua bidest aufgenommen. Es folgt eine zweite Präzipitation durch Zugabe von 20 µl 3 M Na-Azetat, 500 µl absolutem Äthanol und eine 16-stündige Inkubation bei -20°C . Die pelletierte RNA wird wieder zweimal mit je 500 µl 80%igem Äthanol gewaschen und 3 Min. im Vakuum getrocknet. Das Pellet wird in 20 µl sterilem Aqua bidest gelöst. Eine Lagerung der extrahierten RNA ist bei -20°C möglich.

3.1.8 Photometrische Quantifizierung und Reinheitsprüfung von RNA Präparationen

1 µl der in Aqua bidest gelösten RNA wird mit 300 µl Aqua bidest verdünnt. Die Optische Dichte (O.D.) der Verdünnung wird in einem Spektralphotometer (Fa. Beckman) bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Liegt der Quotient $\text{O.D.260}/\text{O.D.280}$ bei 2.0, so liegt eine saubere RNA Präparation vor. Ein Wert > 2.0 läßt auf Verunreinigung durch Phenolreste, ein Wert < 2.0 auf Proteine schließen.

Berechnung des RNA-Gehaltes einer Lösung:

40 µg einzelsträngige RNA pro ml bewirken bei einer Wellenlänge von 260 nm eine Extinktion von 1.0.

$$[\text{RNA}] = \text{O.D.260} \times 40 \times 300 \text{ µg/ml}$$

3.1.9 Elektrophoretische Auftrennung von cDNA Fragmenten in Polyacrylamidgelen

3.1.9.1 Direktsequenzierung viraler RNA mit Hilfe hämagglutinin-spezifischer, synthetischer Oligonukleotidprimer und AMV Reverser Transkriptase

In Gegenwart von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) und Reverser Transkriptase als RNA-abhängige DNA-Polymerase wird an einzelsträngiger viraler RNA eine komplementäre DNA Kopie (cDNA) synthetisiert. Die Reaktion wird in 4 Ansätzen parallel durchgeführt. Dabei wird jedem der Ansätze eines der 4 Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) in einem bestimmten Verhältnis zugegeben. Nach Einbau eines ddNTPs bricht die Polymerisation ab, da die 3'OH-Gruppe zur Anheftung eines weiteren Nukleotids fehlt. Dieses Ereignis erfolgt statistisch verteilt und ist vom Verhältnis der Didesoxy- zu den Desoxynukleotiden abhängig. Es entstehen somit cDNA Fragmente unterschiedlicher Länge, die nach Denaturierung des RNA-DNA-Hybrids ihrer Größe entsprechend gelelektrophoretisch aufgetrennt werden können.

Radiochemikalien:

^{35}S -dCTP (Desoxycytidin 5'-[$\alpha^{35}\text{S}$]thiotriphosphat), Triäthylammoniumsalz; 370 MBq/ml; 24.1 TBq/mMol; Fa. Amersham-Buchler, Codenr. SJ-305

Oligonukleotidprimer:

Abkürzung	Nukleotidnummer	Sequenz	[DNA]
p19	19- 35	d(TAAAAACAACCAAAATG)	17.0 ng/ μl
p182	182-198	d(TGAGGACAGTCACAACG)	9.2 ng/ μl
p304	304-321	d(AATCATGGTCCTACATTG)	18.0 ng/ μl
p513	513-530	d(TTTTACAGAAATTGCTA)	17.0 ng/ μl
p799	799-816	d(CAATAATATTGAGGCAA)	23.0 ng/ μl

Die Oligonukleotidprimer wurden in gereinigter Form freundlicherweise von Herrn Dr. W. Garten, Marburg, zur Verfügung gestellt.

Nukleotide:

2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat, Dinatriumsalz, 100 mM
2'-Desoxycytidin -5'-Triphosphat, Dinatriumsalz, 100 mM
2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat, Dinatriumsalz, 100 mM
2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat, Tetranatriumsalz, 100 mM

2'3'-Dideoxyadenosin-5'-Triphosphat, Trilithiumsalz, 10 mM
2'3'-Dideoxycytidin -5'-Triphosphat, Trilithiumsalz, 10 mM
2'3'-Dideoxyguanosin-5'-Triphosphat, Trilithiumsalz, 10 mM
2'3'-Dideoxythymidin-5'-Triphosphat, Trilithiumsalz, 10 mM
(Fa. Boehringer, Mannheim)

Lösungen:

4 x RT-Puffer

[200 mM Tris-HCl, pH 8.3, 560 mM KCl, 40 mM MgCl₂, 80 mM DTT]
200 µl 1 M Tris-HCl, pH 8.3
280 µl 2 M KCl
40 µl 1 M MgCl₂
80 µl 1 M DTT
400 µl Aqua bidest

Probenpuffer

1350 µl entionisiertes Formamid
100 µl 5 mM EDTA
25 µl 2 % Xylencyanid
25 µl 2 % Bromphenolblau

DESOXYNUKLEOTIDTRIPHOSPHAT STAMMLÖSUNGEN

<u>300.0 µl 3.6 mM d(A+G+T)TP</u>	<u>1000 µl 0.5 mM dCTP</u>
10.8 µl 100 mM dATP	5 µl 100 mM dCTP
10.8 µl 100 mM dGTP	995 µl Aqua bidest
10.8 µl 100 mM dTTP	
267.8 µl Aqua bidest	
	<u>500.0 µl 13.5 µM dCTP</u>
	13.5 µl 0.5 mM dCTP
	482.5 µl Aqua bidest

DIDESOXYNUKLEOTIDTRIPHOSPHAT STAMMLÖSUNGEN

<u>100 µl 0.5 mM ddATP</u>	<u>50 µl 1 mM ddCTP</u>
5 µl 10 mM ddATP	5 µl 10 mM ddCTP
95 µl Aqua bidest	45 µl Aqua bidest
	<u>1000 µl 5 µM ddCTP</u>
	5 µl 1 mM ddCTP
	995 µl Aqua bidest
<u>100 µl 0.5 mM ddGTP</u>	<u>100 µl 0.5 mM ddTTP</u>
5 µl 10 mM ddGTP	5 µl 10 mM ddTTP
95 µl Aqua bidest	95 µl Aqua bidest

SUBSTRATMISCHUNGEN

<u>ddATP+d(A+G+T)TP</u>	<u>ddCTP+d(A+G+T)TP</u>
20 µl 0.5 mM ddATP	20 µl 5.0 µM ddCTP
20 µl 3.6 mM d(A+G+T)TP	20 µl 3.6 mM d(A+G+T)TP
<u>ddGTP+d(A+T+T)TP</u>	<u>ddTTP+d(A+G+T)TP</u>
20 µl 0.5 mM ddGTP	20 µl 0.5 mM ddTTP
20 µl 3.6 mM d(A+G+T)TP	20 µl 3.6 mM d(A+G+T)TP

Berechnung der Einsatzmengen von viraler RNA und Oligonukleotidprimer:

Die zur Reaktion verwendete RNA stellt ein Gemisch aller acht Segmente des Virusgenoms dar. Der Anteil des Hämagglutininmoleküls beträgt etwa 1/10 der RNA Gesamtmenge. Pro Reaktionsansatz werden 3 µg vRNA eingesetzt, was einer Einsatzmenge von 0.3 µg des 4. RNA Segmentes entspricht.

Das Hämagglutinin besteht aus ca. 1700 Nukleotiden. Bei einem Molekulargewicht von 330 pro Nukleotid ergibt sich für das Hämagglutinin ein Molekulargewicht von 500000.

500000 g = 1 Mol; 0.3 µg = 0.6 pMol

Virale RNA und Oligonukleotidprimer werden in einem Konzentrationsverhältnis von 1: 5.5 eingesetzt.

Die Oligonukleotidprimer bestehen aus 17 bzw. 18 Nukleotiden. Es ergibt sich ein Molekulargewicht von 5600 bzw. 6000.

6000 g = 1 Mol; 20 ng = 3.3 pMol

Durchführung:

Hybridisierung viraler RNA mit synthetischen Oligonukleotidprimern = Annealing

Zu 3 µg viraler RNA werden 20 ng Oligonukleotidprimer pipettiert. Das Volumen wird mit Aqua bidest auf 6 µl aufgefüllt. Das Gemisch wird 2 Minuten auf 68°C erhitzt, anschließend 30 Minuten bei 42°C inkubiert und schließlich im Eisbad auf 0°C gekühlt.

Das fertig hybridisierte RNA-Oligonukleotidprimer-Gemisch bezeichnet man als "Annealing-Mix".

Reverse Transkription mit gleichzeitiger radioaktiver Markierung der neu synthetisierten cDNA durch Substratmarkierung

Zu dem "Annealing-Mix" werden 4.1 µl 4 x RT-Puffer, 2.7 µl ³⁵S-dCTP (10 mCi/ml) und 3.8 µl 13.5 µM dCTP pipettiert.

Vier entsprechend beschriftete Reaktionsgefäße werden mit jeweils 1 µl der vier verschiedenen Substratmischungen (S. 44) beschickt. Dazu kommen pro Ansatz 3.75 µl des oben beschriebenen Reaktionsansatzes. In jedes der vier Reaktionsgefäße werden 2 µl Reverse Transkriptase (AMV-Reverse Transkriptase (Fa. Boehringer, Mannheim) 0.6 U/µl in 1 x RT-Puffer) pipettiert. Die Ansätze werden 1 Std. bei 42°C im Wasserbad inkubiert und

anschließend auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 10 µl Probenpuffer wird die Reaktion gestoppt. Die Probe wird im offenen Reaktionsgefäß 10 Min. auf 95°C erhitzt und anschließend im Eisbad auf 0°C gekühlt. Sie kann entweder sofort auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen werden oder bei -20°C aufbewahrt werden.

3.1.9.2 Vorbereitung der Glasplatten

Lösungen:

Acryllösung

10 ml Äthanol

300 µl 10 %ige Essigsäure

3 µl γ-(Methacryloxy)-Propyltrimethoxysilan (Fa. Serva)

Silikonlösung

5 ml Tetrachlorkohlenstoff

200 µl Dimethyl-Dichlorsilan

Durchführung:

Die Vorbereitung der Glasplatten für die Gelelektrophorese erfolgt unter dem Abzug. Die Platten werden mit einer 2 %igen Lösung Count-Off (Fa. NEN) gründlich gesäubert, mit Wasser gespült, abgetrocknet und mit einem Azeton getränkten Papiertuch abgerieben.

Die Gelplatte wird mit einer Acryllösung beschichtet. Mit dem oben beschriebenen Ansatz können eine Glasplatte von 35 x 40 cm oder zwei Glasplatten von 20 x 40 cm beschichtet werden. Die Lösung wird mit einem Papiertuch gleichmäßig verteilt und trockengerieben. Die Platte wird dreimal mit Äther und dreimal mit Äthanol abgerieben und anschließend poliert. Die Deckplatte wird mit der oben beschriebenen Silikonlösung silikonisiert, die ausreichend ist für eine Glasplatte von 35 x 40 cm oder zwei Platten von 20 x 40 cm. Die Behandlung erfolgt nach dem gleichen Schema, das für die Gelplatte beschrieben wurde.

Beide Platten werden anschließend mit Preßluft entstaubt. Die Teflonkämme (Haifischzahnkämme) und Abstandhalter (0.4 mm) werden mit Äthanol gereinigt und mit Klammern zwischen den Glasplatten befestigt.

3.1.9.3 Herstellung von Sequenziergelen

Lösungen:

Tris-Borat-EDTA (TBE-) Puffer, pH 8.3 , 10 x konzentriert

[1 M Tris, 830 mM Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8.3]

121.1 g Tris

51.35 g Borsäure

3.72 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

ad 1000 ml Aqua bidest

Gellösung

[6 % Acrylamid, 7 M Harnstoff, TBE-Puffer, pH 8.3]

84.0 g Harnstoff

11.4 g Acrylamid

0.58 g Bisacrylamid

20 ml TBE-Puffer 10 x konz.

ad 200 ml Aqua bidest

Durchführung:

45 ml der fertigen Gellösung (s.o.) werden durch ein 0.45 μm Einmalfilter (Fa. Millipore) in einen 100 ml Meßkolben filtriert und im Vakuum entgast. Nach Zugabe von 225 μl 10 %igem APS und 45 μl TEMED kann die Gellösung zwischen die um ca. 45° geneigten Glasplatten gegossen werden. Nach dem Einfüllen der Lösung werden die Platten sofort waagrecht gelegt. Nun wird ein Haifischzahnkamm mit der glatten Seite voraus etwa 0.4 mm zwischen die Glasplatten eingeführt und mit Klammern befestigt. Die Polymerisation der Gellösung ist nach ungefähr 15-20 Minuten beendet. Nach Entfernung des Bodenabstandhalters kann das "Gelsandwich" in die Gelapparatur eingesetzt werden. Etwaige Undichtigkeiten zur oberen Pufferkammer werden mit 1 %igem Bacto-Agar abgedichtet.

3.1.9.4 Elektrophoretische Auftrennung

Nach Einfüllen des Elektrodenpuffers (TBE-Puffer, 1 x konz.), wird der Haifischzahnkamm gezogen und umgekehrt wieder eingesetzt, so daß seine Spitzen ungefähr 0.75-1.0 mm in die obere Gelkante einstechen. Im Anschluß an einen Vorlauf von etwa 15 Min. werden die Probestaschen mit Elektrodenpuffer ausgespült um herausdiffundierten Harnstoff zu entfernen. 3 µl der Probe werden pro Geltasche mit einer Sequenzierpipette (Fa. Drummond) aufgetragen.

Die Elektrophorese wird bei 1.4 kV durchgeführt. Die Dauer der Auftrennung hängt ab von dem zu lesenden Bereich der Sequenz. Im allgemeinen sind pro Primer zwei Läufe mit einer Dauer von 1 Std. 45 Min., bzw. 3 Std. 30 Min. erforderlich. Nach Beendigung der Elektrophorese werden Gelplatte und Deckplatte vorsichtig voneinander getrennt und für die Autoradiographie vorbereitet.

3.1.9.5 Autoradiographie

Das auf der Gelplatte gebundene Gel wird 15-20 Min. in 10 %iger Essigsäure fixiert, anschließend unter fließendem Wasser gespült und im Trockenschrank 30 Min. bei 110-150°C getrocknet. Dem auf der Gelplatte getrockneten Gel mit ^{32}S -markierter cDNA wird ein Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR oder Kodak X-OMAT S) direkt aufgelegt und je nach Intensität der radioaktiven Strahlung und Empfindlichkeit des Röntgenfilms 1-5 Tage exponiert.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Vergleichende Untersuchungen der antigenetischen Eigenschaften von Hämagglutininen humaner und porciner Influenza A H1N1 Stämme mit Hyperimmunseren gegen verschiedene Isolate vom Subtyp H1N1

H1N1 Influenzaviren von Mensch und Schwein wurden im Hämagglutinationsinhibitionstest mit Kaninchen- und Frettchenhyperimmunseren untersucht. Die verwendeten Virusantigene sowie die Kaninchen- bzw. Frettchenhyperimmunseren sind nach Gruppen gegliedert in Tabelle 6 aufgeführt.

3.2.1.1 Reaktionen mit Antiseren gegen klassische Schweineinfluenzaviren (1937-1976)

Die HI-Titer der klassischen Schweineinfluenzaviren und ihrer Antigene wichen um höchstens drei Titerstufen von den jeweils homologen Werten ab (Tab. 7).

Die Antiseren gegen sw/Ia/15/30 und NJ/8/76 reagierten mit sw/N1rl/38 und sw/Cam/39 drei Titerstufen höher als mit den klassischen Schweineinfluenza Hämagglutininen der Stämme sw/29/37 und sw/shope/54. Die Antiseren gegen Schweineinfluenzaviren die zwischen 1937 und 1967 isoliert worden waren zeigten eine abnehmende bzw. deutlich geringere Reaktionsbereitschaft mit den Stämmen sw/N1rl/38 und sw/Cam/39.

Von den Antiseren gegen sw/Ia/15/30 und NJ/8/76 wurde FM/1/47 stärker inhibiert als WSN/33, während die Antiseren gegen die Stämme von 1937 und 1967 diese Antigene nicht unterschieden, oder WSN/33 stärker inhibierten als FM/1/47.

Tabelle 6:

Antigene und Antiseren, die in Hämagglutinationsinhibitionstesten verwendet wurden.

VIRUSANTIGEN	ANTISERUM
1. Klassische Schweineinfluenzaviren:	
-	sw/Iowa/15/30 ^b
sw/29/37	sw/29/37 ^a
sw/shope/54	sw/shope/54 ^a
sw/MAY/54	-
NJ/8/76 ^c	NJ/8/76 ^{b,c}
2. Europäische Schweineinfluenzaviren:	
sw/Nordirland/38	sw/Nordirland/38 ^a
sw/Cambridge/39	sw/Cambridge/39 ^{a,b}
3. Humane Influenzaviren:	
WSN/33	WSN/33 ^a
NWS/33	-
-	PR/8/34 ^a
-	CAM/46 ^a
FM/1/47	FM/1/47 ^a
-	USSR/90/77 ^b
-	Brazil/11/78 ^b

^a Kaninchenhyperimmunseren

^b Frettchenhyperimmunseren

^c Der Stamm NJ/8/76 wurde vom Menschen isoliert. Er trägt jedoch ein Hämagglutinin, das von dem klassischer Schweineinfluenzaviren serologisch nicht zu unterscheiden ist.

Tabelle 7:

Hämagglutinationsinhibitionstest (HI) von H1 Hämagglutininen mit Antisera gegen klassische Schweineinfluenzaviren (1937-1976).

Die RDE-Behandlung der Seren und die Durchführung des HI-Testes wurden in Punkt 3.1.5 beschrieben. Die Titer geben den reziproken Wert der Serumverdünnung an, bei der vier hämagglutinierende Einheiten des entsprechenden Virusantigens noch vollständig inhibiert wurden.

Antiserum ----- Antigen	sw/Ia/15/30 ^b	sw/29/37 ^a	sw/shope/54 ^a	NJ/8/76 ^{b,c}
sw/29/37	160	5120	1280	160
sw/shope/54	160	1280	2560	160
sw/MAY/54	nd	1280	2560	nd
NJ/8/76 ^c	nd	640	1280	640
sw/NIrl/38	1280	640	160	1280
sw/Cam/39	1280	40	40	1280
NWS/33	nd	80	20	nd
WSN/33	20	160	20	80
FM/1/47	320	<10	<10	160

^a Kaninchenhyperimmunseren

^b Frettchenhyperimmunseren

^c Der Stamm NJ/8/76 wurde vom Menschen isoliert. Er trägt jedoch ein Hämagglutinin, das von dem klassischer Schweineinfluenzaviren serologisch nicht zu unterscheiden ist.

nd: nicht durchgeführt

3.2.1.2 Reaktionen mit Antiseren gegen europäische Schweineinfluenzaviren (1938-1939)

Das Antiserum gegen sw/NIrl/38 und das Kaninchenhyperimmunserum gegen sw/Cam/39 inhibierten am stärksten den ältesten untersuchten Schweineinfluenzastamm sw/29/37; dagegen war die Reaktion des Frettchenhyperimmunserums gegen sw/Cam/39 am ausgeprägtesten mit NJ/8/76 (Tab. 8).

Die beiden europäischen Schweineinfluenzastämme reagierten unterschiedlich mit ihren homologen bzw. heterologen Antiseren.

Von den Hämagglutininen humaner Influenzastämme reagierten WSN/33 und NWS/33, die beide aus dem ersten Isolat eines humanen Influenzavirus durch Laborpassagen hervorgegangen sind (Stuart-Harris, 1939; Francis & Moore, 1940) bis zu einer Verdünnung von 1:1280 mit dem Antiserum gegen sw/NIrl/38, hingegen nur zu niedrigen Titern mit dem Antiserum gegen sw/Cam/39. Die antigenen Determinanten von FM/1/47 wurden von den Antiseren gegen sw/NIrl/38 und sw/Cam/39 nicht erkannt.

3.2.1.3 Reaktionen mit Antiseren gegen humane Influenzaviren (1933-1978)

Das Antiserum gegen WSN/33 inhibierte die Hämagglutination durch Schweineinfluenzaviren eine Titerstufe höher als die durch das homologe Antigen (Tab. 9). Es unterschied die europäischen Schweineinfluenzavirus Hämagglutinine, wobei es mit sw/NIrl/38 stärker reagierte als mit sw/Cam/39. Auffällig ist die Reaktion des Antiserums mit NWS/33, die schwächer war als mit sw/NIrl/38, obwohl WSN/33 und NWS/33 ein gemeinsames Elternvirus haben (Stuart-Harris, 1939; Francis & Moore, 1940). Mit allen Stämmen reagierte das Antiserum gegen WSN/33 zu höheren Titern als das gegen PR/8/34, außer mit FM/1/47.

Antiseren gegen humane Stämme von 1946 an zeigten nur wenig Reaktionen mit allen klassischen Schweineinfluenzastämmen und mit dem europäischen Isolat sw/Cam/39. Sw/NIrl/38 reagierte mit den Antiseren gegen CAM/46, FM/1/47 und Brazil/11/78 stärker als der humane Stamm WSN/33 (und NWS/33). Nur das Antiserum gegen USSR/90/77 inhibierte WSN/33 stärker als sw/NIrl/38.

Tabelle 8:

Hämagglutinationsinhibitionstest (HI) von H1 Hämagglutininen mit Antiseren gegen europäische Schweineinfluenzaviren (1938-1939).

Die RDE-Behandlung der Seren und die Durchführung des HI-Testes wurden in Punkt 3.1.5 beschrieben. Die Titer geben den reziproken Wert der Serumverdünnung an, bei der vier hämagglutinierende Einheiten des entsprechenden Virusantigens noch vollständig inhibiert wurden.

Antiserum ----- Antigen	sw/NIrl/38 ^a	sw/Cam/39 ^a	sw/Cam/39 ^b
sw/29/37	640	640	20
sw/shope/54	20	320	20
sw/MAY/54	20	160	20
NJ/8/76 ^c	20	80	160
sw/NIrl/38	2560	320	320
sw/Cam/39	320	5120	2560
NWS/33	320	80	20
WSN/33	1280	80	40
FM/1/47	<10	<10	<10

^a Kaninchenhyperimmunseren

^b Frettchenhyperimmunseren

^c Der Stamm NJ/8/76 wurde vom Menschen isoliert. Er trägt jedoch ein Hämagglutinin, das von dem klassischer Schweineinfluenzaviren serologisch nicht zu unterscheiden ist.

Tabelle 9:

Hämagglutinationsinhibitionstest (HI) von H1 Hämagglutininen mit Antiserum gegen humane Influenzaviren (1933-1978)

Die RDE-Behandlung der Seren und die Durchführung des HI-Testes wurden in Punkt 3.1.5 beschrieben. Die Titer geben den reziproken Wert der Serumverdünnung an, bei der vier hämagglutinierende Einheiten des entsprechenden Virusantigens noch vollständig inhibiert wurden.

Antiserum ----- Antigen	WSN/33 ^a	PR/8/34 ^a	CAM/46 ^a	FM/1/47 ^a	USSR/77 ^b	Brazil/78 ^b
sw/29/37	5120	320	<10	80	nd	nd
sw/shope/54	5120	320	10	80	nd	nd
sw/MAY/54	5120	320	10	80	nd	nd
NJ/8/76 ^c	5120	160	<10	40	nd	nd
sw/NIr1/38	1280	640	640	160	80	640
sw/Cam/39	160	20	<10	40	40	80
NWS/33	640	160	160	nd	nd	nd
WSN/33	2560	1280	80	40	160	40
FM/1/47	20	40	2560	20480	2560	1280

^a Kaninchenhyperimmunseren

^b Frettchenhyperimmunseren

^c Der Stamm NJ/8/76 wurde vom Menschen isoliert. Er trägt jedoch ein Hämagglutinin, das von dem klassischer Schweineinfluenzaviren serologisch nicht zu unterscheiden ist.

nd: nicht durchgeführt

Für die beiden europäischen Schweineinfluenzastämme kann zusammenfassend festgestellt werden:

- (1) Die europäischen Schweineinfluenzastämme sind verschieden von der sehr homogenen Gruppe der klassischen amerikanischen Schweineinfluenzaviren.
- (2) Obwohl die Stämme in aufeinanderfolgenden Jahren isoliert wurden unterscheiden sie sich in ihren antigenetischen Eigenschaften.
- (3) Der Stamm A/swine/Cambridge/39 reagiert mit allen Antiseren außer seinem homologen zu gleichen oder geringeren Titern als der Stamm A/swine/Nordirland/38.
- (4) Aufgrund ihrer antigenen Eigenschaften können die europäischen Schweineinfluenzaviren von 1938/39 keiner bekannten Untergruppe des facettenreichen Subtyps der H1 Hämagglutinine zugeordnet werden.

3.2.2 Vergleichende Untersuchungen der antigenetischen Eigenschaften humaner und porciner Influenza A H1N1 Stämme mit monoklonalen Antikörpern gegen humane H1N1 Influenzastämme

Humane und porcine H1N1 Influenzaviren wurden im HI-Test mit 22 monoklonalen Antikörpern untersucht. Zehn monoklonale Antikörper gegen das Hämagglutinin von A/PR/8/34 (H12, H15, H42, H62, H132, H187, H201, H221, H280 und H308) reagierten mit keinem der untersuchten Antigene. Von dem monoklonalen Antikörper H198 wurde die Hämagglutinationsaktivität der Stämme sw/29/37 und FM/1/47 bis zu einer Verdünnung 1:100 inhibiert (Tab. 10). Die sechs monoklonalen Antikörper, die gegen das Hämagglutinin von FM/1/47 gerichtet sind (H6, H13, H92, H131, H258 und H290), reagierten nur mit ihrem homologen Antigen. Vier von fünf monoklonalen Antikörpern gegen das Hämagglutinin von Brazil/11/78 (H2, H29, H142, H170) reagierten mit FM/1/47 (Tab. 10). Das Epitop des monoklonalen Antikörpers H22 ist in FM/1/47 so verändert, daß es nicht mehr erkannt wurde. Auffällig ist die Reaktion des monoklonalen Antikörpers H2 mit sw/Cam/39 bis zu einer Verdünnung 1:320.

Tabelle 10:

Hämagglutinationsinhibitionstest (HI) von H1 Hämagglutininen mit monoklonalen Antikörpern gegen die Hämagglutinine der Influenza A Stämme A/PR/8/34 und A/Brazil/11/78.

In der Tabelle sind die Reaktionen der monoklonalen Antikörpern mit heterologen Antigenen angegeben. Die vollständige Liste der untersuchten monoklonalen Antikörper ist unter Punkt 3.1.3 und im Text aufgeführt.

Monokl. AK ----- Antigen	H198 ^a	H2 ^b	H29 ^b	H142 ^b	H170 ^b
sw/29/37	100				
sw/Cam/39		320			
FM/1/47	100	3200	3200	1600	100

^a Monoklonaler AK gegen A/PR/8/34

^b Monoklonaler AK gegen A/Brazil/11/78

Um die Nukleotidsequenz zu bestimmen, wurde an der viralen RNA mittels Oligonukleotidprimern und reverser Transkriptase ein komplementärer cDNA Strang synthetisiert. Da die virale RNA im negativen Sinn vorliegt, entspricht die cDNA Kopie der mRNA, und die Aminosäuresequenz kann direkt aus der Nukleotidsequenz der cDNA abgelesen werden.

Alle antigenetischen Determinanten des Hämagglutinins, die sich im Lauf der Antigendrift verändern, sind in der HA₁ Untereinheit des Moleküls lokalisiert. Verwandtschaftsverhältnisse wurden deshalb häufig nur anhand von Sequenzdaten der HA₁ Anteile bestimmt (Daniels et al., 1985; Raymond et al., 1986; Stevens et al., 1987), weil hier der Verlauf der Antigendrift am deutlichsten zum Ausdruck kommt.

Auch der vorliegenden Untersuchung wurden nur die den HA₁ Anteilen entsprechenden Sequenzen zugrundegelegt. Sie umfassen die Nukleotidtripletts, bzw. Aminosäuren 11-329 in der Nummerierung nach Winter et al. (1981). Winter et al. (1981) verwendeten Einschübe (z.B. 260, 260a, 261) oder Auslassungen, um die Sequenzen von Hämagglutininen verschiedener Subtypen maximal zur Deckung zu bringen. Dies ermöglicht einen zuverlässigen und wenig fehleranfälligen Vergleich. Falls nicht anders angegeben, beziehen sich in dieser Arbeit alle Nummern von Nukleotidtripletts und Aminosäuren auf die Nummerierung nach Winter et al. (1981). Einzelne Basen eines Tripletts werden als z.B. 185/1-3 angegeben. Kohlenhydratanheftungsstellen (Asn-X-Ser/Thr) werden mit der Position des Asparagins beziffert.

3.2.3.1 Influenza A/swine/29/37, A/swine/Nordirland/38 und A/swine/Cambridge/39

Die HA₁ Anteile der Hämagglutinine von A/swine/Nordirland/38 und A/swine/Cambridge/39 bestehen aus jeweils 326 Aminosäuren, die von 978 Nukleotiden kodiert werden (Abb. 12). Die Transkription der vRNA von A/swine/29/37 wurde durch den ersten Oligonukleotidprimer p19 nicht initiiert. Deshalb konnte die Nukleotidsequenz hier erst ab Triplett 52 bestimmt werden; sie besteht aus 855 Nukleotiden, die 285 Aminosäuren kodieren können (Abb. 12).

Fünf mögliche Glykosylierungsstellen (20/21, 33, 165, 271 und 289) kommen in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von sw/NIrl/38 vor. Sw/Cam/39 besitzt die gleichen Kohlenhydratanheftungsstellen wie sw/NIrl/38 und zusätzlich kann 131 glykosyliert sein. Die Aminosäuren 20 bis 23 (Asn-Asn-Ser-Thr) beinhalten zwei mögliche Kohlenhydratanheftungsstellen, die jedoch wahrscheinlich nicht beide genutzt werden. Im Hämagglutinin von A/Japan/305/57 (H2N2) ist nur am Asparagin (21) eine Zuckerseitenkette gebunden (Waterfield et al., 1980). In der Aminosäuresequenz von sw/29/37 liegen die Glykosylierungsstellen 94a und 289.

3.2.3.2 Influenza A/NWS/33

Mit den gegebenen Oligonukleotidprimern konnten die Nukleotidtripletts bzw. Aminosäuren 155 bis 214 des Hämagglutinins von A/NWS/33 direkt sequenziert werden. Der Abschnitt besteht aus 60 Aminosäuren, die von 90 Nukleotiden kodiert werden (Abb. 11). Er liegt am distalen Ende des Hämagglutinin in einer Region, die überdurchschnittlich variabel ist: 16 Aminosäuren tragen zu einem der vier Antigenorte des Hämagglutinins von A/PR/8/34 bei (Caton et al., 1982).

Die Aminosäuresequenz enthält keine Kohlenhydratanheftungsstellen.

3.2.4 Vergleich von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

3.2.4.1 Influenza A/swine/Iowa/15/30, A/swine/29/37 und A/New Jersey/11/76; Erstellung einer Referenzsequenz für weitere Vergleiche

Wie in Punkt 3.2.3.1 beschrieben, konnte die komplette Nukleotidsequenz des HA₁ Anteils des Hämagglutinins von sw/29/37 nicht bestimmt werden. Um eine Sequenzanalyse dennoch auf sw/29/37 als Referenzsequenz beziehen zu können, mußte das fehlende Teilstück (11-51) aus einer anderen, möglichst ähnlichen Sequenz eines klassischen Schweineinfluenzahämagglutinins ergänzt werden.

Sw/Ia/15/30 (Air et al., 1981) und NJ/11/76 (Both et al., 1983) unterscheiden sich in dem Bereich, der für sw/29/37 nicht bestimmt werden konnte (11 bis 51) in 13 Nukleotiden und einer Aminosäure (Abb. 8). Die Glykosylierungsstellen 20/21 und 33, die in sw/NIrl/38 und sw/Cam/39 vorkamen sind in beiden Sequenzen ebenfalls vorhanden.

In einem Teilstück von 43 Tripletts (52 bis 92) differiert NJ/11/76 von sw/29/37 in 18 Nukleotid- und sechs Aminosäurepositionen, gegenüber nur drei Nukleotid- und einem Aminosäureaustausch zwischen sw/29/37 und sw/Ia/15/30 (Abb. 9).

Die nicht identifizierten Tripletts 11 bis 51 von sw/29/37 wurden deshalb aus der Sequenz von sw/Ia/15/30 ergänzt. Die resultierende Arbeitssequenz ("sw/29/37") setzt sich damit aus den Tripletts 11-51 von sw/Ia/15/30 und 52-329 von sw/29/37 zusammen.

11										20									
NJ/11/76TT																			
sw/15/30 GAC ACA CTA TGT ATA GGT TAC CAT GCA										AAT AAT TCA ACC GAC ACT GTT									
sw/15/30 D T L C I G Y H A										N N S T D T V									
NJ/11/76 - - - - - - - - -										- - - - - - -									
30										40									
NJ/11/76 ..TA ..ATA ..AT ..T																			
sw/15/30 GAC ACA GTA CTC GAG AAG AAC GTA ACC										GTG ACA CAC TCT GTT AAC CTG									
sw/15/30 D T V L E K										N V T V T H S V N L									
NJ/11/76 - - - - - - - - -										- - - - - - - - - -									
50																			
NJ/11/76A ..TG																			
sw/15/30 CTT GAA GAC AGC CAC AAC GGA AAA CTA																			
sw/15/30 L E D S H N G K L																			
NJ/11/76 - - - R - - - - -																			

Abbildung 8: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von Triplet 11 bis 51 des HA₁ Anteils des Hämagglutinins von Influenza A/swine/Iowa/15/30 und A/New Jersey/11/76.

Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Referenzsequenz sw/Ia/15/30 (Air et al., 1981) ist voll ausgeschrieben. In den entsprechenden Sequenzen von NJ/11/76 (Both et al., 1983) sind identische Nukleotide als Punkt, identische Aminosäuren als Strich angegeben; nur veränderte Nukleotide und Aminosäuren sind ausgeschrieben. Kohlenhydratanheftungsstellen (Asn-X-Ser/Thr) sind eingerahmt. Die Nummerierung entspricht Winter et al. (1981).

Bei der Analyse einer kleinen Anzahl alter Stämme, die von verschiedenen Spezies isoliert wurden, stellt deren lange und teilweise unbekannte Passagengeschichte eine zusätzliche Unsicherheit dar. WSN/33 und NWS/33 sind unabhängig voneinander als neurotrope Varianten aus dem humanen Influenzastamm WS/33 (Smith et al., 1933) gezüchtet worden, deshalb können Sequenzunterschiede erst im Labor entstanden sein. Um über Labormutationen Aufschluß zu erhalten, wurden Teile der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von A/WSN/33 (Hiti et al., 1981) und A/NWS/33 (Air et al., 1981; eigene Untersuchungen) mit A/swine/Iowa/15/30 (Air et al., 1981) bzw. A/swine/29/37 verglichen.

	11										20									
WSN/33	...	...	A..	...	...	..C	...	...	..G	..C	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...
NWS/33	...	...	A..	...	...	..C	...	...	..G	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
sw/15/30	GAC	ACA	CTA	TGT	ATA	GGT	TAC	CAT	GCA	AAT	AAT	TCA	ACC	GAC	ACT					
sw/15/30	D	T	L	C	I	G	Y	H	A	N N S T				D	T					
NWS/33	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSN/33	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30										40									
WSN/33	...	...	...	A..	T..	...	...	..T	..G	G..A	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	...
NWS/33	...	...	...	C..	...	...	...	..T	..G	..A	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	...
sw/15/30	GTT	GAC	ACA	GTA	CTC	GAG	AAG	AAC	GTA	ACC	GTG	ACA	CAC	TCT	GTT					
sw/15/30	V	D	T	V	L	E	K	N V T			V	T	H	S	V					
NWS/33	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSN/33	-	-	-	I	F	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50										53 a									
WSN/33	...	...	..C	...	...	..A	...	...	..G	...	...	...	..A	T..	AAA					
NWS/33	...	...	..C	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	..A	T..	AAA					
sw/15/30	AAC	CTG	CTT	GAA	GAC	AGC	CAC	AAC	GGA	AAA	CTA	TGT	AGA	CTA	GGG					
sw/15/30	N	L	L	E	D	S	H	N	G	K	L	C	R	L	G					
NWS/33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	K					
WSN/33	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	K	-	K					

WSN/33	...	...	...	C..	...	T..	...	...	...	..C	..C	A..	...	...	
NWS/33	...	...	...	C..	...	T..	...	...	...	..C	..C	...	...	...	
sw/15/30	GGA	ATA	GCC	CCA	TTA	CAA	CTG	GGG	AAA	TGT	AAT	ATT	GCC	GGA	TGG
sw/15/30	G	I	A	P	L	Q	L	G	K	C	N	I	A	G	W
NWS/33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSN/33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-

70

77 a

80

WSN/33	...	...	...	..T	...	...	...	..C	..CA	...	..T	C..	..C	..A	...
NWS/33	...	...	...	...	...	...	...	..C	..CA	...	..T	C..	..C	..A	...
sw/15/30	CTC	TTG	GGA	AAC	CCA	GAA	TGC	GAT	TTG	CTG	CTC	ACA	GTG	AGC	TCA
sw/15/30	L	L	G	N	P	E	C	D	L	L	L	T	V	S	S
NWS/33	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	P	A	R	-
WSN/33	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	P	A	R	-
												Cb	Cb	Cb	Cb

90

WSN/33	...	...	..C	...	...	...	...	..C	..A	...
NWS/33	...	...	..C	...	...	...	...	..C	..A	...
sw/15/30	TGG	TCC	TAT	ATT	GTA	GAA	ACA	TCG	AAC	
sw/15/30	W	S	Y	I	V	E	T	S	N	
NWS/33	-	-	-	-	-	-	-	P	-	
WSN/33	-	-	-	-	-	-	-	P	-	

Abbildung 10: Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Triplet 11 bis 91 der HA₁-Untereinheit des Hämagglutinins von Influenza A/swine/Iowa/15/30 mit A/NWS/33 und A/WSN/33

Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von sw/Ia/15/30 (Air et al., 1981) ist voll ausgeschrieben. In den entsprechenden Sequenzen von WSN/33 (Hiti et al., 1981) und NWS/33 (Air et al., 1981) sind identische Nukleotide als Punkt, identische Aminosäuren als Strich angegeben; nur veränderte Nukleotide und Aminosäuren sind ausgeschrieben. Kohlenhydratanheftungsstellen sind eingerahmt. Aminosäuren aus Antigenorten des Hämagglutinins von A/PR/8/34 (H1N1) (Caton et al., 1982) sind mit den entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet. Die Nummerierung entspricht Winter et al. (1981).

Verglichen mit sw/Ia/15/30 finden sich von Triplet 11 bis 92 in 29 Nukleotiden und 8 Aminosäuren in WSN/33 und NWS/33 die gleichen Mutationen (Abb. 10).

Abweichend von NWS/33 besitzt WSN/33 weitere 6 Nukleotid- und 4 Aminosäureaustausche, von denen der Austausch in 35 eine Glykosylierungsstelle zerstört, der Austausch in 67 dagegen die Anheftung einer zusätzlichen Kohlenhydratseitenkette ermöglicht. Nur eine Aminosäure (29) ist in beiden Varianten verschieden mutiert: zu Leucin in NWS/33 und zu Isoleucin in WSN/33.

Von Triplet 155 bis 214 tragen die Varianten in 26 Nukleotiden und fünf Aminosäuren gleiche Austausche (Abb. 11). Fünf Nukleotide und drei Aminosäuren sind nur in NWS/33 mutiert. In WSN/33 findet man drei individuelle Nukleotid- und eine Aminosäuremutation. Drei Aminosäuren sind in beiden Stämmen verschieden mutiert, davon liegen zwei (196 und 198) im Antigenort Sb (Caton et al., 1982).

160

WSN/33	AC.GCG .C. ..TG														
NWS/33	AC. ..A .C. .AG ..CCGTG														
sw/29/37	GTG	AAG	AAG	GGA	GAT	TCA	TAT	CCA	AAG	CTC	AGC	AAA	TCC	TAT	GTT
sw/29/37	V	K	K	G	D	S	Y	P	K	L	S	K	S	Y	V
NWS/33	T	-	T	E	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-
WSN/33	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	N	-	-	-
	Sb		Sa		Sb	Sa	Sa			Sa	Sa	Sa	Sa	Sa	Gal

170

180

WSN/33	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
--------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Cal

WSN/33	..G	T.C	.G.	...	GA.	..G	...	..G	...	...	...	AGT	...	.G.	A..
NWS/33	..G	T..	.G.	...	GA.	..G	...	..G	...	...	...	..T	...	.T.	A..
sw/29/37	CCN	CCT	ACC	AGT	ACT	GAT	CAA	CAA	AGT	CTC	TAT	CAA	AAT	GCA	GAT
sw/29/37	P	P	T	S	T	D	Q	Q	S	L	Y	Q	N	A	D
NWS/33	-	S	S	-	D	E	-	-	-	-	-	H	-	V	N
WSN/33	-	S	S	-	D	E	-	-	-	-	-	S	-	G	N
								Sb	Sb			Sb		Sb	

200

210

WSN/33	...	...	..C	.C.	...	.C.	..T	...	..T	...	...	..A	...	...	...
NWS/33	...	...	..C	.C.	...	.T.	..T	...	..T	...	...	G..	..A	...	...
sw/29/37	GCT	TAT	GTG	TTT	GTA	GGG	TCA	TCA	AAA	TAT	AAC	AGG	AGG	TTC	ACC
sw/29/37	A	Y	V	F	V	G	S	S	K	Y	N	R	R	F	T
NWS/33	-	-	-	S	-	V	-	-	N	-	-	G	-	-	-
WSN/33	-	-	-	S	-	A	-	-	N	-	-	-	-	-	-

Cal

Abbildung 11: Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Triplet 155 bis 214 der HA₁ Untereinheit des Hämagglutinins von Influenza A/NWS/33 und A/WSN/33 mit A/swine/29/37.

Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von sw/29/37 ist ausgeschrieben. In den entsprechenden Sequenzen von WSN/33 (Hiti et al., 1981) und NWS/33 (Air et al., 1981) sind nur veränderte Nukleotide und Aminosäuren ausgeschrieben; identische Nukleotide sind als Punkt, identische Aminosäuren als Strich angegeben. Aminosäuren, die zu einem der Antigenorte des Hämagglutinins von A/PR/8/34 (H1N1) gehören (Caton et al., 1982) sind mit den entsprechenden Buchstaben markiert. Die Nummerierung entspricht Winter et al. (1981).

3.2.4.3 Influenza A/swine/29/37, A/swine/Nordirland/38,
A/swine/Cambridge/39, A/PR/8/34, A/WSN/33 und
A/New Jersey/11/76

Die Nukleotid- und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Hämagglutinine von "sw/29/37", sw/NIrl/38 und sw/Cam/39 sind gegenläufig in Abbildung 12 dargestellt, zusammen mit den Sequenzen von PR/8/34 (Winter et al., 1981), WSN/33 (Hiti et al., 1981) und NJ/11/76 (Both et al., 1983). Die Nukleotidsequenzen geben die Sequenz der cDNA wieder. Die Referenzsequenz ("sw/29/37") ist voll ausgeschrieben. Für alle übrigen Sequenzen sind nur abweichende Nukleotide bzw. Aminosäuren angegeben; gleiche Nukleotide sind als Punkt, gleiche Aminosäuren als Strich dargestellt. Die Nahtstelle zwischen den Sequenzen von sw/Ia/15/30 und sw/29/37 an Triplet 51/52 in der Referenzsequenz ist mit einem Stern gekennzeichnet. Aminosäuren, die zu einem der Antigenorte (Sa, Sb, Ca und Cb) von H1 Hämagglutininen beitragen (Caton et al., 1982), sind mit den entsprechenden Buchstaben bezeichnet. Kohlenhydratanheftungsstellen sind eingeraht.

Der HA₁ Anteil der untersuchten Hämagglutinine besteht aus 326 Aminosäuren, die von 978 Nukleotiden kodiert werden, mit Ausnahme des HA₁ Anteils von WSN/33, der durch die Deletion von drei Nukleotiden in Position 131 um eine Aminosäure kürzer ist.

	11										20																												
WSN/33	...	...	A	...	...	...	C	...	...	...	G	...	...	C	...	...	...																						
sw/Nlrl/38	...	...	A	...	...	...	C	...	...	...	G	...	...	C	...	...	...																						
sw/Cam/39	...	...	A	...	...	...	C	...	...	G	...	...	C	...	...	...																							
PR/8/34	...	...	A	...	...	...	C	...	...	...	G	...	...	C	...	...	...																						
NJ/11/76	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T	...	...	...	...	...	T	...																						
"sw/29/37"	GAC	ACA	CTA	TGT	ATA	GGT	TAC	CAT	GCA	AAT	AAT	TCA	ACC	GAC	ACT																								
"sw/29/37"	D	T	L	C	I	G	Y	H	A	<table border="1"> <tr><td>N</td><td>N</td><td>S</td><td>T</td></tr> <tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr> <tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr> <tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr> <tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr> <tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr> </table>				N	N	S	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	T
N	N	S	T																																				
-	-	-	-																																				
-	-	-	-																																				
-	-	-	-																																				
-	-	-	-																																				
-	-	-	-																																				
NJ/11/76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																							
PR/8/34	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																							
sw/Cam/39	-	-	I	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-																							
sw/Nlrl/38	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																							
WSN/33	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																							

	30										40																							
WSN/33	...	...	A	...	T	...	...	...	T	...	G	G	A	...	...	...	T																	
sw/Nlrl/38	...	...	C	...	...	...	...	...	T	...	G	...	A	...	...	...	T																	
sw/Cam/39	...	...	C	...	...	...	...	...	T	...	G	...	A	...	...	...	T																	
PR/8/34	...	...	...	...	G	...	...	...	T	...	G	...	A	...	...	...	...																	
NJ/11/76	...	...	T	...	...	A	...	A	...	...	T	...	A	...	A	...																		
"sw/29/37"	GTT	GAC	ACA	GTA	CTC	GAG	AAG	AAC	GTA	ACC	GTG	ACA	CAC	TCT	GTT																			
"sw/29/37"	V	D	T	V	L	E	K	<table border="1"> <tr><td>N</td><td>V</td><td>T</td></tr> <tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr> <tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr> <tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr> <tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr> <tr><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr> </table>				N	V	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	T	H	S	V
N	V	T																																
-	-	-																																
-	-	-																																
-	-	-																																
-	-	-																																
-	-	-																																
NJ/11/76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																		
PR/8/34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																		
sw/Cam/39	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																		
sw/Nlrl/38	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																		
WSN/33	-	-	-	I	F	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-																		

	50										*	53										a
WSN/33	...	...	...	C	...	...	...	A	...	...	...	G	...	...	...	...	A	T	...	AAA		
sw/Nlrl/38	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	G	...	...	...	...	A	T	...	AAA		
sw/Cam/39	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	G	...	...	...	...	A	T	...	AAA		
PR/8/34	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T	...	AAA		
NJ/11/76	...	T	...	T	...	...	...	A	...	T	...	...	G	...	...	...	A	...	G	...		
"sw/29/37"	AAC	CTG	CTT	GAA	GAC	AGC	CAC	AAC	GGA	AAA	CTA	TGT	AGA	CTA	GGG							
"sw/29/37"	N	L	L	E	D	S	H	N	G	K	L	C	R	L	G							
NJ/11/76	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-						
PR/8/34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K						
sw/Cam/39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	K						
sw/Nlrl/38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	K						
WSN/33	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	K	-	K						

	100										110									
WSN/33	..T	...	...	...	...	..C	...	...	..G	...	...	..G	...	...	...					
sw/Nlrl/38	..T	...	...	...	...	..C	...	...	..G	...	...	..G	...	...	...					
sw/Cam/39	..T	...	...	...	...	..C	...	...	..G	...	...	..G	...	...	...					
PR/8/34	..T	...	...	...	...	..C	...	...	..G	..G	...	..G	...	...	...					
NJ/11/76	...	...	...	...	...	..C	A.T	...	...	..G	...	...	..G	...	...					
"sw/29/37"	TAC	CCA	GGA	GAT	TTC	ATT	GAC	TAT	GAA	GAA	CTG	AGA	GAG	CAA	TTG					
"sw/29/37"	Y	P	G	D	F	I	D	Y	E	E	L	R	E	Q	L					
NJ/11/76	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-					
PR/8/34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
sw/Cam/39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
sw/Nlrl/38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
WSN/33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					

	120										125 a b									
WSN/33	...	...	..A	...	...	..A	...	...	..A	...	...	..G	GA.							
sw/Nlrl/38	...	...	..A	...	...	..A	...	...	..A	...	...	..G	GA.							
sw/Cam/39	...	...	..A	...	...	..A	...	...	..A	...	...	..G	GA.							
PR/8/34	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	GA.							
NJ/11/76	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	..C	...	..G	...							
"sw/29/37"	AGC	TCA	GTG	TCA	TCA	TTC	GAA	AGA	TTC	GAG	ATA	TTT	CCC	AAA	ACA					
"sw/29/37"	S	S	V	S	S	F	E	R	F	E	I	F	P	K	T					
NJ/11/76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
PR/8/34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E					
sw/Cam/39	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	E					
sw/Nlrl/38	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	E					
WSN/33	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	E					

Cb

	130										137 a									
WSN/33	...	..A	...	...	..C	..C	///	...	TT.	..AC	..A	...	..A	..T.	T..					
sw/Nlrl/38	...	..A	...	...	..C	..C	A.C	...	CT.	..AC	..A	...	..A	..T.	T..					
sw/Cam/39	...	..A	...	...	..C	..C	A.C	...	...	..A.	..A	...	..A	AA.	T..					
PR/8/34	..C	..A	...	...	..C	..C	A.C	...	...	..A.	..A	...	...	...	...					
NJ/11/76	...	...	...	...	...	...	...	...	..A.	...	...	..G	...	...	...					
"sw/29/37"	AGT	TCG	TGG	CCC	AAT	CAT	GAA	ACA	ACC	AGA	GGT	GTA	ACG	GCA	GCA					
"sw/29/37"	S	S	W	P	N	H	E	T	T	R	G	V	T	A	A					
NJ/11/76	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-					
PR/8/34	-	-	-	-	-	-	N	-	-	K	-	-	-	-	-					
sw/Cam/39	-	-	-	-	-	-	N	-	-	K	-	-	-	K	S					
sw/Nlrl/38	-	-	-	-	-	-	N	-	L	N	-	-	-	V	S					
WSN/33	-	-	-	-	-	-	/	-	-	F	N	-	-	V	S					

Sa Sa

WSN/33	...	T..	C..	AGG	...	AA.	.G.	..T	...	...	...	..G	...	...
sw/NIr1/38	...	T..	C..	AGG	...	AA.	.G.	..T	...	...	...	..G	...	...
sw/Cam/39	...	T..	C..	AGG	...	.A.	.G.	..T	...	...	...	..G	...	...
PR/8/34	...	T..	C..	..G	..G	AA.	.G.	..T	...	...	...	..G	...	...
NJ/11/76	...	..T	...	...	...	..A.	...	..C	...	...	...	..A.	...	...
"sw/29/37"	TGC	CCC	TAT	GCT	GGA	GCA	ANC	AGC	TTT	IAC	AGA	AAT	TTA	CTA TGG
"sw/29/37"	C	P	Y	A	G	A	?	S	F	Y	R	N	L	L W
NJ/11/76	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	I	-
PR/8/34	-	S	H	-	-	K	S	-	-	-	-	-	-	-
sw/Cam/39	-	S	H	R	-	E	S	-	-	-	-	-	-	-
sw/NIr1/38	-	S	H	R	-	K	S	-	-	-	-	-	-	-
WSN/33	-	S	H	R	-	K	S	-	-	-	-	-	-	-
		Ca2			Ca2		Ca2							

160

WSN/33	...	AC.	...	...	..G	...	...	..C	WSN/33	..G	.C.	..T	...	...
sw/NIr1/38	...	AC.	...	...	..G	..C	...	..C	sw/NIr1/38	..G	.A.	..T	...	...
sw/Cam/39	...	AC.	...	...	..G	A.C	...	..C	sw/Cam/39	G..	..G	.A.	..T	...
PR/8/34	...	AC.	G..	...	.AG	.GC	...	..C	PR/8/34	...	..G	.AA	..T	..T
NJ/11/76	...	..A	..A	.A.	A..	...	..C	...	NJ/11/76	...	...	...	...	...
"sw/29/37"	CTG	GTG	AAG	AAG	GGA	GAT	TCA	TAT	CCA	AAG	CTC	AGC	AAA	TCC TAT
"sw/29/37"	L	V	K	K	G	D	S	Y	P	K	L	S	K	S Y
NJ/11/76	-	-	-	-	E	N	-	-	-	-	-	-	-	-
PR/8/34	-	T	E	-	E	G	-	-	-	-	-	K	N	-
sw/Cam/39	-	T	-	-	-	N	-	-	-	E	-	N	N	-
sw/NIr1/38	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N	-
WSN/33	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	N	-
			Sb		Sa	Sb	Sa		Sa	Sa		Sa	Sa	Sa

170

180

WSN/33	..G	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	..T	...	..T	...
sw/NIr1/38	..G	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	..T	...	..T	...
sw/Cam/39	..G	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	..T	..C	..T	...
PR/8/34	..G	...	..G	...	...	...	...	..A	..G	...	..T	A..	..T	...
NJ/11/76	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	..C	A..	..T	...
"sw/29/37"	GTT	AAC	AAT	AAA	GGG	AAA	GAA	GTC	CTT	GTG	CTA	TGG	GGG	GTT CAC
"sw/29/37"	V	N	N	K	G	K	E	V	L	V	L	W	G	V H
NJ/11/76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-
PR/8/34	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-
sw/Cam/39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sw/NIr1/38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSN/33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

WSN/33	..C	..G	T.C	.G.	...	GA.	..G	...	..G	...	...	AGT	...	.G.
sw/NIr1/38	..C	..G	T.	.G.	...	.A.	..G	...	..G	...	...	..T	...	.G.
sw/Cam/39	..C	..G	T.	.A.	...	.A.	A.	...	..G	.C.	...	..T	...	...
PR/8/34	..C	..G	T.	.A.	...	.AG	...	...	..G	.A.	A.	...	..G	..A.
NJ/11/76	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...
"sw/29/37"	CAT	CCN	CCT	ACC	AGT	ACT	GAT	CAA	CAA	AGT	CTC	TAT	CAA	AAT GCA
"sw/29/37"	H	P	P	T	S	T	D	Q	Q	S	L	Y	Q	N A
NJ/11/76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PR/8/34	-	-	S	N	-	K	-	-	-	N	I	-	-	- E
sw/Cam/39	-	-	S	N	-	N	N	-	-	T	-	-	H	-
sw/NIr1/38	-	-	S	S	-	N	E	-	-	-	-	-	H	- G
WSN/33	-	-	S	S	-	D	E	-	-	-	-	-	S	- G
										Sb	Sb		Sb	Sb

200

210

WSN/33	A.	...	...	..C	.C.	...	.C.	..T	...	..T	...	...	..A	...
sw/NIr1/38	A.	...	...	..C	.C.	...	.C.	..T	...	..T	...	...	..A	...
sw/Cam/39	A.	...	...	..C	.C.	...	.T.	..T	...	..T	...	..T	..A	...
PR/8/34	A.	...	...	..C	.C.	...	.T.	A.T	...	..T	...	...	..A	..T
NJ/11/76	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	..A
"sw/29/37"	GAT	GCT	TAT	GTT	TTT	GTA	GGG	TCA	TCA	AAA	TAT	AAC	AGG	AGG TTC
"sw/29/37"	D	A	Y	V	F	V	G	S	S	K	Y	N	R	R F
NJ/11/76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K -
PR/8/34	N	-	-	-	S	-	V	T	-	N	-	-	-	-
sw/Cam/39	N	-	-	-	S	-	V	-	-	N	-	-	-	-
sw/NIr1/38	N	-	-	-	S	-	A	-	-	N	-	-	-	-
WSN/33	N	-	-	-	S	-	A	-	-	N	-	-	-	-

Cal

220

WSN/33	...	..G	...	...	..T	..A	..G	...	..A	.TA	.A.	.A.	..A	CAT	...
sw/NIr1/38	...	..G	...	...	..T	..A	...	...	..A	.TA	...	.C.	..A	C.T	...
sw/Cam/39	...	..G	...	...	..T	..A	...	...	..A	.TA	...	.A.	..A	..T	...
PR/8/34	...	..G	...	...	...	.AA	...	...	..A	.TA	...	.A.	..A	G.T	...
NJ/11/76	..AG	...	...	...	..A	...	...	...	..T.	...	...	..A	G.	...	...
"sw/29/37"	ACC	CCA	GAA	ATA	GCA	GCG	AGA	CCC	AAG	GCG	AGA	GGT	CAG	ACA	GGG
"sw/29/37"	T	P	E	I	A	A	R	P	K	A	R	G	Q	T	G
NJ/11/76	K	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	A	-
PR/8/34	-	-	-	-	-	E	-	-	-	V	-	D	-	A	-
sw/Cam/39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	D	-	-	-
sw/NIr1/38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	A	-	P	-
WSN/33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	K	D	-	H	-

Ca2 Ca2

	230										240									
WSN/33	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
sw/Nir1/38	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
sw/Cam/39	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
PR/8/34	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
NJ/11/76	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
"sw/29/37"	AGG	ATG	AAC	TAT	TAC	TGG	ACA	TTA	CTA	GAA	CCT	GGA	GAC	ACA	ATA					
"sw/29/37"	R	M	N	Y	Y	W	T	L	L	E	P	G	D	T	I					
NJ/11/76	-	-	S	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-					
PR/8/34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-					
sw/Cam/39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
sw/Nir1/38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
WSN/33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					

Cal

	250																			
WSN/33	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
sw/Nir1/38	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
sw/Cam/39	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
PR/8/34	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
NJ/11/76	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
"sw/29/37"	ACA	TTT	GAG	GCA	ACT	GGA	AAT	CTA	GTG	GCA	CCA	AGA	TAT	GCT	TTC					
"sw/29/37"	T	F	E	A	T	G	N	L	V	A	P	R	Y	A	F					
NJ/11/76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-					
PR/8/34	I	-	-	-	N	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-					
sw/Cam/39	I	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	W	-	-	-					
sw/Nir1/38	I	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	W	-	-	-					
WSN/33	I	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	W	-	-	-					

	260										270									
WSN/33	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
sw/Nir1/38	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
sw/Cam/39	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
PR/8/34	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
NJ/11/76	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
"sw/29/37"	GCA	ATG	AAT	AGA	GGT	TCT	GGA	TCC	GGC	ATC	ATC	ACT	TCA	GAC	GCA					
"sw/29/37"	A	M	N	R	G	S	G	S	G	I	I	T	S	D	A					
NJ/11/76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	W	-	-					
PR/8/34	-	L	S	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
sw/Cam/39	-	L	S	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
sw/Nir1/38	-	L	S	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
WSN/33	-	L	S	-	-	F	E	-	-	-	-	-	-	-	-					

N	-
N	-
N	-
N	-

WSN/33	T..	A..	...	..G	...	A..	...	...	...	..A	...	...	..A	T..
sw/NIrl/38	T..	A..	...	..G	...	A..	...	...	...	..A	...	...	..A	...
sw/Cam/39	T..	A..	...	..G	...	A..	...	...	...	..A	...	...	..A	...
PR/8/34	T..	A..	...	..G	...	A..	...	...	...	..A	...	..T.	..A	...
NJ/11/76	...	..T	...	...	...	A..	...	...	...	..A	...	..A.	...	..C
"sw/29/37"	CCA	GTG	CAT	GAT	TGT	GAC	ACG	AAG	TGT	CAA	ACN	CCC	CAG	GGT GCT
"sw/29/37"	P	V	H	D	C	D	T	K	C	Q	T	P	Q	G A
NJ/11/76	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	K	- -
PR/8/34	S	M	-	E	-	N	-	-	-	-	-	-	L	- -
sw/Cam/39	S	M	-	E	-	N	-	-	-	-	-	-	-	- -
sw/NIrl/38	S	M	-	E	-	N	-	-	-	-	-	-	-	- -
WSN/33	S	M	-	E	-	N	-	-	-	-	-	-	-	S

290

300

WSN/33	...	...	...	..AT	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	...
sw/NIrl/38	...	...	...	..T	...	...	...	...	..G.	..C	...	...	...	...
sw/Cam/39	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	...
PR/8/34	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	...
NJ/11/76	...	...	..C.	...	...	..A	..T	...	...	...	...	...	..T	...
"sw/29/37"	ATA	AAC	AGC	AGC	CTC	CCT	TTC	CAG	AAT	ATA	CAT	CCA	GTC	ACA ATA
"sw/29/37"	I	N	S	S	L	P	F	Q	N	I	H	P	V	T I
NJ/11/76	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- -
PR/8/34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- -
sw/Cam/39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- -
sw/NIrl/38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	- -
WSN/33	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- -

310

WSN/33	...	...	...	...	..T	...	..GG	...	...	..G	..G	...	..T.
sw/NIrl/38	...	...	...	...	..T	...	..GG	...	...	..G	..G	...	..T.
sw/Cam/39	...	...	...	...	..T	...	..GG	...	...	..G	..G	...	..T.
PR/8/34	...	...	...	...	...	...	..GG	...	..G.	...	..G	..G	..T.
NJ/11/76	...	..A	..T	...	..T	...	..C	..A	...	..G	...	...	...
"sw/29/37"	GGA	GAG	TGC	CCA	AAA	TAC	GTC	AAA	AGT	ACC	AAA	TTA	AGA ATG GCT
"sw/29/37"	G	E	C	P	K	Y	V	K	S	T	K	L	R M A
NJ/11/76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- -
PR/8/34	-	-	-	-	-	-	-	R	-	A	-	-	- V
sw/Cam/39	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	- V
sw/NIrl/38	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	- V
WSN/33	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	- V

WSN/33	...	...	C..	...	...	...	...	..C	..T	...	..AC	...
sw/NIrl/38	...	...	C..	...	...	...	...	..C	..T	...	..C	...
sw/Cam/39	...	...	C..	...	...	...	...	..C	..T	...	..C	...
PR/8/34	...	...	C..	..G	...	..T	..G	..C	..T	...	..C	...
NJ/11/76	...	...	C..	..G	..T	G..	..G	...	..T	...	...	...
"sw/29/37"	ACA	GGA	TTA	AGA	AAC	ATC	CCA	TCT	ATC	CAA	TCT	AGA
"sw/29/37"	T	G	L	R	N	I	P	S	I	Q	S	R
NJ/11/76	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-
PR/8/34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sw/Cam/39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sw/NIrl/38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSN/33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-

Abbildung 12: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des HA₁ Anteils der Hämagglutinine von Influenza "A/swine/29/37", A/New Jersey/11/76, A/PR/8/34, A/WSN/33, A/swine/Nordirland/38 und A/swine/Cambridge/38.

Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Referenzsequenz "sw/29/37" ist voll ausgeschrieben. In den entsprechenden Sequenzen von NJ/11/76 (Both et al., 1983), PR/8/34 (Winter et al., 1981), WSN/33 (Hiti et al., 1981), sw/NIrl/38 und sw/Cam/39 sind nur veränderte Nukleotide und Aminosäuren ausgeschrieben; identische Nukleotide sind als Punkt, identische Aminosäuren als Strich dargestellt. Die Deletion von Triplet, bzw. Aminosäure 131 in WSN/33 ist als Schrägstriche eingetragen. Die Nahtstelle (Triplet 51/52) zwischen den Sequenzen von sw/Ia/15/30 und sw/29/37 in der Referenzsequenz "sw/29/37" ist mit einem Stern markiert. Mögliche Glykosylierungsstellen (Asn-X-Ser/Thr) sind eingerahmt. Aminosäuren, die zu einer der vier Antigenorte von A/PR/8/34 (H1N1) gehören (Caton et al., 1982), sind mit den entsprechenden Buchstaben bezeichnet. Die Nummerierung entspricht Winter et al.(1981).

3.2.4.3.1 Anzahl der Austausche

Die Aminosäuresequenzen der HA₁ Anteile der sechs Influenza A Stämme differieren in 93 Positionen von der Referenzsequenz "sw/29/37". Im Stamm NJ/11/76 haben sich 27 Aminosäureaustausche angesammelt (Tab. 11), was im HA₁ Anteil (326 Aminosäuren) einer Mutation pro 12.07 Aminosäuren entspricht. Die Stämme PR/8/34 und WSN/33, sowie die Stämme sw/NIrl/38 und sw/Cam/39 haben 54 und 61, bzw. 53 und 54 Aminosäureaustausche erworben. Im HA₁ Anteil dieser vier Stämme fällt also durchschnittlich ein Austausch auf 5.89 Aminosäuren. Damit ist die Austauschrate doppelt so hoch, wie in NJ/11/76.

Tabelle 11:

Anzahl von Nukleotid- und Aminosäureaustauschen zwischen den HA₁ Unter-einheiten verschiedener H1 Hämagglutinine.

	"sw/29/37"	NJ/11/76	PR/8/34	sw/Cam/39	sw/NIrl/38	WSN/33
	Mutierte Nukleotide ^a					
"sw/29/37"		101	147	144	144	160
NJ/11/76	27		195	195	193	207
PR/8/34	54	67		60	62	78
sw/Cam/39	54	71	33		24	43
sw/NIrl/38	53	70	35	16		28
WSN/33	61	76	43	28	18	
	Mutierte Aminosäuren ^b					

^a Zahlen über der Diagonale der homologen Positionen beziehen sich auf die Nukleotidaustausche

^b Zahlen unter der Diagonale der homologen Positionen beziehen sich auf die Aminosäureaustausche

Die geringste Anzahl von Nukleotid- und Aminosäureaustauschen (24 und 16) trennt sw/NIrl/38 und sw/Cam/39; am weitesten sind mit 207 Nukleotid- und 76 Aminosäureaustauschen die Sequenzen von WSN/33 und NJ/11/76 voneinander entfernt (Tab. 11).

Insgesamt ist die Zahl der Aminosäureaustausche pro Zeiteinheit in den Hämagglutinininen klassischer Schweineinfluenzaviren geringer als in denen humaner Stämme. 27 Aminosäuremutationen im HA₁ Anteil von NJ/11/76 in 39 Jahren entspricht einer Variation von 2.1 % in 10 Jahren.

Die europäischen Schweineinfluenzaviren stehen mit Nukleotidsequenzhomologien zwischen 80.06 und 85.27 % und Aminosäuresequenzhomologien zwischen 78.22 und 83.74 % den klassischen Schweineinfluenzaviren nicht so nahe wie mit Nukleotidsequenzhomologien von 93.66 bis 97.13 % und Aminosäuresequenzhomologien von 89.26 bis 94.47 % den humanen Stämmen (Tab. 12). Ihre Sequenzen weichen sogar weniger von den beiden humanen Stämmen ab, als diese untereinander (92.02 % Nukleotid- und 86.80 % Aminosäuresequenzhomologie).

Die Homologien aller untersuchten Stämme sind mit "sw/29/37" um durchschnittlich 5 % (Nukleotidsequenzen) und 4.75 % (Aminosäuresequenzen) höher als mit NJ/11/76.

Das Verhältnis von Nukleotidaustauschen pro Aminosäuremutation liegt zwischen "sw/29/37" und NJ/11/76 bei 3.7. Bei den humanen Stämmen beträgt dieses Verhältnis 1.8, bei den europäischen Schweineinfluenzaviren sogar nur 1.5.

Die Aminosäuresequenz ist in den klassischen Schweineinfluenzastämmen höher konserviert als die Nukleotidsequenz; in allen europäischen Schweineinfluenza- und humanen Influenzastämmen ist umgekehrt die Nukleotidsequenz höher konserviert als die Aminosäuresequenz.

Für gewöhnlich sind Aminosäuresequenzunterschiede zwischen Stämmen eines Subtyps weniger als 10 % (Air, 1981), aber auch Unterschiede von beinahe 20 % wurden zwischen je zwei Stämmen der Subtypen H7 und H10 festgestellt (Webster et al., 1982).

Tabelle 12:

Homologien der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des HA₁ Anteiles von H1 Hämagglutininen.

	"sw/29/37"	NJ/11/76	PR/8/34	sw/Cam/39	sw/NIr1/38	WSN/33
	% Konservierte Nukleotide ^a					
"sw/29/37"		89.67	84.96	85.27	85.27	83.64
NJ/11/76	91.21		80.06	80.06	80.26	78.83
PR/8/34	83.43	79.44		93.86	93.66	92.02
sw/Cam/39	83.43	78.22	89.87		97.54	95.60
sw/NIr1/38	83.74	78.52	89.26	95.09		97.13
WSN/33	81.28	76.68	86.80	91.41	94.47	
	% Konservierte Aminosäuren ^b					

^a Zahlen über der Diagonale der homologen Positionen beziehen sich auf die Nukleotidsequenzhomologien

^b Zahlen unter der Diagonale der homologen Positionen beziehen sich auf die Aminosäuresequenzhomologien

3.2.4.3.2 Anordnung der Austausche im Molekül

Die Mutationen in NJ/11/76 liegen anscheinend zufällig im HA₁ Anteil verteilt, ohne sichtbare Beziehung zur Lage (oberflächlich/tief) der betroffenen Aminosäuren im dreidimensionalen Modell, oder zu antigenetisch wichtigen Regionen (Abb. 12, 13). Die Austausche in sw/N1rl/38 und sw/Cam/39 sind nach einem ähnlichen Muster verteilt, wie die Austausche in PR/8/34 und WSN/33, weshalb die insgesamt 222 Austausche der vier Stämme auf nur 77 verschiedene Aminosäurepositionen verteilt sind (Abb. 12, 13).

Diese fallen in Regionen höherer Variabilität zusammen, teilweise deckungsgleich mit Regionen, die als antigenetische Determinanten bekannt sind, oder als hypervariabel beschrieben wurden (Caton et al., 1982; Concannon et al., 1984).

Darüberhinaus gibt es in den analysierten Sequenzen Anhäufungen von Mutationen, die an variable Anteile des HA₁ Moleküls nach Caton et al. (1982) und Concannon et al. (1984) unmittelbar angrenzen (Abb. 13). Region C (51-53a) wird dadurch um eine Aminosäure (54) verlängert. Region C (275-278) beginnt wahrscheinlich bereits mit Aminosäure 271. Region B (187-196) erweitert sich um eine Aminosäure (186) zum N-Terminus und bis 208 zum C-Terminus. (Diese Region beinhaltet dann auch 198 Sb und 207 Cal.)

Weitere Mutationsanhäufungen (91-96, 223-227 und 260-264) sind ohne sichtbare Beziehung zu antigenetisch relevanten Regionen.

Abbildung 13: Verteilung von Aminosäureaustauschen in der HA₁ Untereinheit der Hämagglutininmoleküle von H1N1 Influenzastämmen, bezogen auf die Referenzsequenz "sw/29/37".

Jeder senkrechte Strich steht für einen Aminosäureaustausch in der jeweiligen Sequenz. Die hypervariablen Regionen A (129-146), B (155-160, 187-196), C (51-53a, 275-278), D (163-166), E (77-82) nach Concannon et al. (1984) sind fett gedruckt. Aminosäuren der Antigenorte eines H1 Hämagglutinins (PR/8/34) (Caton et al., 1982) sind mit einem Stern markiert.

3.2.4.3.3 Art der Austausche

Aminosäurepositionen in konservierten Anteilen des Moleküls weisen auf z.T. lineare Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den humanen Influenzaviren und den europäischen Schweineinfluenzaviren hin. Zu den Austauschen in NJ/11/76 ist dagegen keine Beziehung erkennbar (Abb. 12). Die Mehrzahl der beobachteten Mutationen stimmt mit dem in Abbildung 14 dargestellten Schema überein.

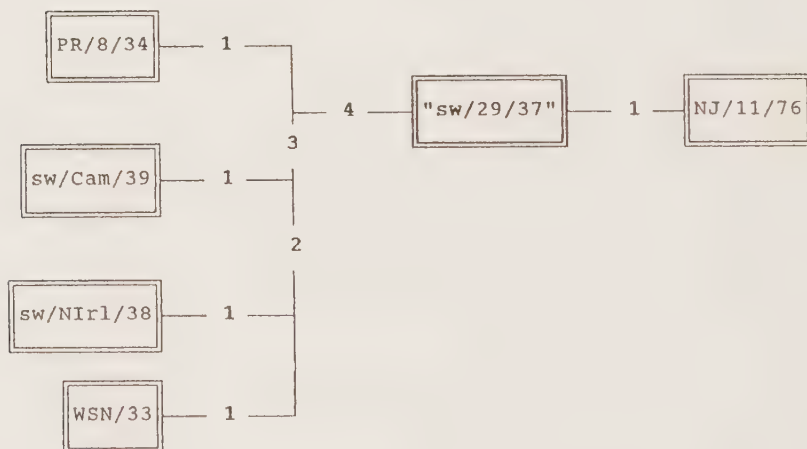


Abbildung 14: Schema von Aminosäureaustauschen in den HA1 Untereinheiten der Hämagglutininmoleküle der untersuchten Influenzastämme (H1N1), bezogen auf "sw/29/37" als Referenzsequenz.

1. Austausche, die nur in einem Stamm beobachtet werden.
2. Identische Austausche in sw/NIrl/38 und WSN/33
3. Identische Austausche in sw/Cam/39, sw/NIrl/38 und WSN/33
4. Identische Austausche in PR/8/34, sw/Cam/39, sw/NIrl/38 und WSN/33

In Regionen mit höherer Variabilität, die meist antigenetische Determinanten enthalten, verdecken häufig zusätzliche Nukleotidmutationen innerhalb eines Triplets die Linearität der Verwandtschaftsbeziehungen, z.B. in 134, 159, 165, 189 oder 196. Diese sind dann zwar nicht mehr aus der Aminosäuresequenz abzulesen, aber oft in den entsprechenden Nukleotidtriplets noch sichtbar, wie zum Beispiel in Triplett 134 und 189. Keine Aminosäure zeigt die gleiche Mutation in sw/NIrl/38 und PR/8/34, die in sw/Cam/39 und WSN/33 nicht vorkommt und umgekehrt. Ebenso wenig findet man identische Mutationen in WSN/33 und PR/8/34, die in sw/Cam/39 und sw/NIrl/38 fehlen.

Gleiche Aminosäureaustausche in sonst grundsätzlich verschiedenen Stämmen sind selten und können unabhängig entstanden sein, wie der Austausch Serin zu Arginin in 46 von WSN/33 und NJ/11/76. (Der Stamm WSN/33, der vom gleichen Elternvirus stammt wie WSN/33, trägt in 46 noch Serin (Air et al., 1981b).) Ähnlichkeiten dieser Art sind jedoch häufiger zwischen PR/8/34 und NJ/11/76 als zwischen anderen Stämmen. Eine Ursache für diese Beobachtung ist nicht bekannt.

3.2.4.3.4 Glykosylierungsstellen

Die Veränderung des Musters möglicher Kohlenhydratanheftungsstellen (Asn-X-Ser/Thr) in den HA₁ Anteilen der untersuchten Stämme zeigt ähnliche Gesetzmäßigkeiten, wie bei den Aminosäureaustauschen: keine zusätzliche Glykosylierungsstelle entsteht in gleicher Position nur in WSN/33 und sw/Cam/39, oder PR/8/34 und sw/NIrl/38, oder WSN/33 und PR/8/34 (Abb. 12, 15).

Die Glykosylierungsstellen 20/21, 33 und 289, die sich im Stamm des Hämagglutininmoleküls befinden, sind in allen Stämmen außer WSN/33 konserviert.

Jeweils eine Glykosylierungsstelle der klassischen Schweineinfluenzastämme (94a), beziehungsweise der europäischen Schweineinfluenza- und humanen Influenzastämme (271) befindet sich zwischen Kopf- und Stammregion des Hämagglutinins.

Der globuläre Kopfteil des Hämagglutinins der klassischen Schweineinfluenzastämme enthält keine weiteren Glykosylierungsstellen.

In PR/8/34 und sw/Cam/39 ist Position 131 möglicherweise glykosyliert. Diese Stelle befindet sich einerseits nahe bei der antigenetischen Bindungsstelle Sa (Caton et al., 1982) und andererseits nahe an der Rezeptorbindungsstelle.

Die Aminosäuren der Anheftungsstelle 165 von sw/Cam/39 und sw/NIrl/38 gehören zur antigenetischen Bindungsstelle Sa.

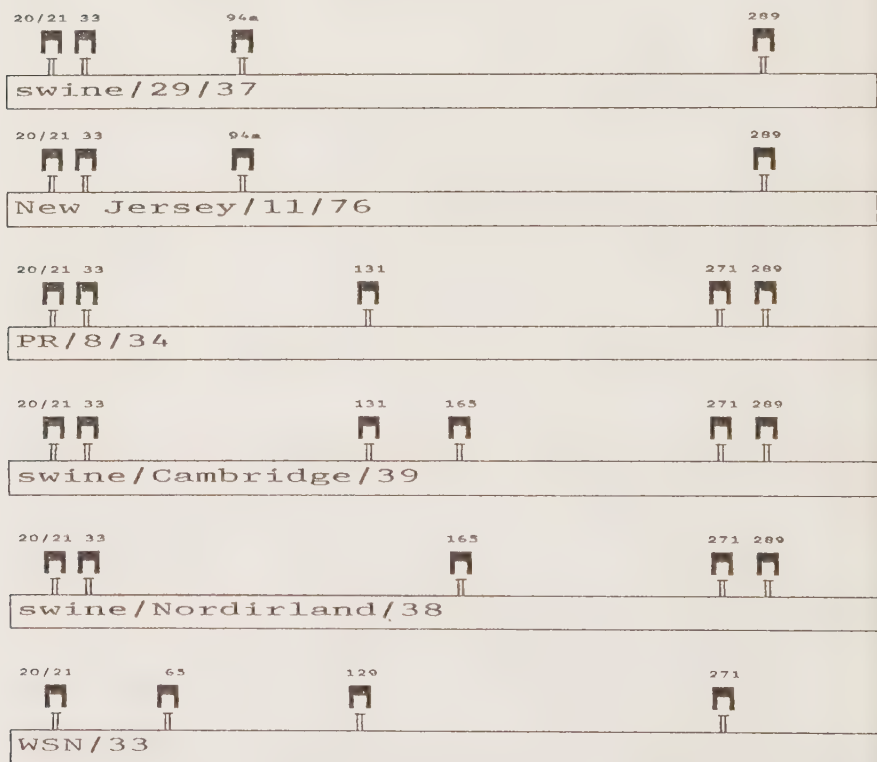


Abbildung 15: Verteilung von Glykosylierungsstellen in der HA₁ Untereinheit der untersuchten H1 Hämagglutinine.

WSN/33 hat die Glykosylierungsstellen in 33 und 289 verloren, die in allen anderen hier untersuchten Stämmen, sowie in allen H1 Hämagglutininen von 1950-57 und 1977-86 (Daniels et al., 1985; Raymond et al., 1986; Stevens et al., 1987) konserviert sind.

Die Anheftungsstelle 65 wird nur bei WSN/33 beobachtet. Sie liegt an der Basis der Kopfreion des Hämagglutinins in der Nähe der antigenetischen Region Cb.

Durch die Deletion der Aminosäure 131 entsteht in WSN/33 die Anheftungsstelle 129 an Stelle von 131.

3.2.5 Ursprung der Hämagglutiningene von A/swine/Nordirland/38 und A/swine/Cambridge/39

Eine Sequenzanalyse der Gene, die das Hämagglutinin europäischer Schweineinfluenzaviren kodieren, zeigte, daß 27 Aminosäurereste der europäischen Schweineinfluenzastämme in humanen Influenzastämmen konserviert sind, in klassischen Schweineinfluenzastämmen aber verschieden. Dies und weitere Austausche, die zwischen den humanen und europäischen Schweineinfluenzastämmen beobachtet wurden, lassen den Schluß zu, daß die Hämagglutinine von sw/NIrl/38 und sw/Cam/39 nicht von Hämagglutininen klassischer Schweineinfluenzaviren, sondern wahrscheinlich von Stämmen früher humaner H1N1 Influenzaviren abstammen, die vor 1933 im Menschen zirkulierten und WSN/33 ähnlicher waren als PR/8/34. Da einige Nukleotide (133/2, 134/3, 190/3, 198/2, 227/1 oder 249/3) und Aminosäuren (190, 198) nur in WSN/33 und sw/NIrl/38 ausgetauscht sind, in sw/Cam/39 aber mit PR/8/34 oder "sw/29/37" übereinstimmen, stammt das Hämagglutinin von sw/Cam/39 wahrscheinlich von einem noch älteren humanen Stamm als sw/NIrl/38. Abbildung 16 zeigt einen hypothetischen Stammbaum.

Von ihrem gemeinsamen Ursprung an gerechnet haben sw/NIrl/38 und sw/Cam/39 etwa die gleiche Anzahl an Mutationen zusätzlich erworben. Die meisten Austausche von sw/NIrl/38 findet man in der Sequenz von WSN/33 wieder. Damit zeigt sw/NIrl/38 Eigenschaften, die für Schweineinfluenzaviren typisch sind: Konservierung eines alten humanen Stammes mit wenig Veränderungen von Nukleotidsequenz (Webster et al., 1982; Scholtissek et al., 1983) und Antigenität (Meier-Ewert et al., 1970).

Von ihrem gemeinsamen Ursprung an gerechnet hat sw/NIr1/38 nur drei zusätzliche Aminosäureaustausche erworben, WSN/33 dagegen mindestens 15, obwohl einige davon sicher Labormutationen sind, wie in Punkt 3.2.4.2 deutlich wurde.

Während die meisten Austausche von sw/NIr1/38 auch in WSN/33 vorkommen, findet man viele Austausche von sw/Cam/39 in keiner bekannten Sequenz anderer H1 Hämagglutinine wieder.

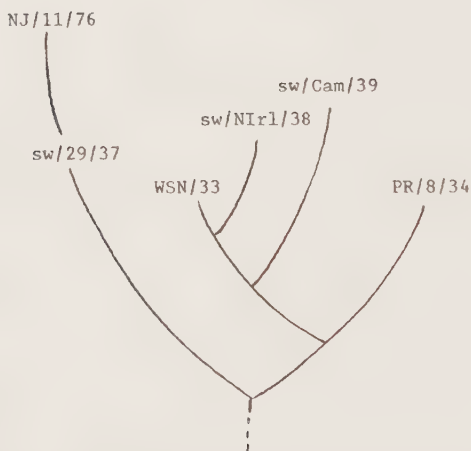


Abbildung 16: Hypothetischer Stammbaum der untersuchten Influenza A (H1N1) Stämmen

1946 traten im Menschen H1N1 Influenzastämme auf, deren Antigenität grundlegend von den 1933-46 zirkulierenden H1 Stämmen verschieden war. Nachdem die H1 Hämagglutinine 1957 durch andere Subtypen abgelöst worden waren, tauchten 1977 erneut H1 Stämme im Menschen auf (z.B. USSR/90/77), die antigenetisch und genetisch von einem Isolat aus dem Jahr 1950 (FW/50) praktisch nicht zu unterscheiden waren. Die Antigendrift nahm von 1977 an einen anderen Verlauf als von 1950 an (Raymond et al., 1986). Ein Vergleich der Sequenzdaten von H1 Hämagglutininen, die nach 1950 und 1977 isoliert worden waren (Daniels et al., 1985; Raymond et al., 1986; Stevens et al., 1987) mit den hier analysierten Stämmen zeigte, daß die Nukleotidsequenzhomologie von PR/8/34 (84.96 %), WSN/33 (83.64 %) und USSR/90/77 (81.79 %) mit "sw/29/37", sowie die entsprechenden Aminosäuresequenzhomologien von PR/8/34 (83.43 %), WSN/33 (81.28 %) und USSR/77 (80.36 %) etwa gleich sind. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzhomologie von PR/8/34, WSN/33 bzw. USSR/90/77 mit "sw/29/37" differiert nur um 2.35 % bzw. 0.31 %.

Die Verteilung der Mutationen im Hämagglutinin folgt einem anderen Muster als in den Stämmen WSN/33, PR/8/34, sw/N1rl/38 und sw/Cam/39 (Abb. 17).

Einige Aminosäuren, die sich in den frühen H1(H1) Stämmen von der Aminosäuresequenz von "sw/29/37" unterscheiden, mutieren in späteren Stämmen wieder zurück (z.B. 129, 140, 142).

Einige Aminosäuren, die in allen H1 Stämmen nach 1950 gleich sind, unterscheiden sich von den Sequenzen der Stämme WSN/33, PR/8/34, sw/N1rl/38 und sw/Cam/39 (z.B. 79, 189).

Einige Aminosäuren, die in den Stämmen WSN/33, PR/8/34, sw/N1rl/38 und sw/Cam/39 mutiert sind, zum Teil sogar mehrfach, tragen in H1 Stämmen nach 1950 die gleiche Aminosäure wie "sw/29/37" (z.B. 134, 165, 166, 278).

Einige Aminosäurepositionen (z.B. 53, 118, 137a, 138, 156, 159) verbinden den Stamm PR/8/34 enger als die übrigen H1(H0) Hämagglutinine mit den H1(H1) Hämagglutininen.

	11	20	30	40
"sw/29/37"	D T L C I G Y H A	N N S I	D T V D T V L E K	N V T V T H S V
NJ/11/76	.	.	.	.
PR/8/34	. I .	.	.	.
sw/Cam/39	. I . . . Q .	.	. L .	.
sw/Nlrl/38	. I . . .	.	. L .	.
WSN/33	. I . . .	.	. I F .	. A .
FW/50	.	.	.	.
FLW/52	. I . . .	.	.	.
QSL/54	. I . . .	.	.	.
DEN/57	. I . . .	.	.	.

	50	53a	60
"sw/29/37"	N L L E D S H N G K L C R L G G I A P L Q L G K C N I A G W		
NJ/11/76	 R K H R		
PR/8/34	 K		
sw/Cam/39	 K . K		
sw/Nlrl/38	 K . K		
WSN/33	 R K . K		. . . T .
FW/50	.	.	.
FLW/52	 K . K		
QSL/54	 K		
DEN/57	 K N		

	70	77a	80	90	94a
"sw/29/37"	L L G N P E C D L L L T V N S W S Y I V E T S N S D				N G T C
NJ/11/76	 E S K				
PR/8/34	 P . P . R P I .				
sw/Cam/39	 S . P A R P E T . A .				
sw/Nlrl/38	 S . P A R P E A .				
WSN/33	 S . P A R P E A .				
FW/50	.	.	.	A . . P . E	
FLW/52	V E S . . S N R A . . P . E I .				
QSL/54	V E S . . S N R A . . P . E				
DEN/57	V E S . . S N R A . . P . E				

CbCb CbCbCb

	100	110	120	125a b
"sw/29/37"	Y P G D F I D Y E E L R E Q L S S V S S F E R F E I F P K T			
NJ/11/76	 N			
PR/8/34				E
sw/Cam/39			L	E
sw/NIr1/38			L	E
WSN/33			L	E
FW/50	. . . F . A			E
FLW/52	 A			E
QSL/54	 A			E
DEN/57	 A			E

Cb

	c	130	137a	140	150
"sw/29/37"	S S W P N H E T T R G V T A A C P Y A G A ? S F Y R N L L W				
NJ/11/76	 N			N	I .
PR/8/34	 N	K	S H	K S	
sw/Cam/39	 N	K	K S . S H R .	E S	
sw/NIr1/38	 N . L N	V S . S H R .	K S		
WSN/33	 /	F N	V S . S H R .	K S	
FW/50	R K	N V	S H K . K S		
FLW/52	R K . N . I	S H E R K S	K	V .	
QSL/54	R K	S H . R K S	K	V .	
DEN/57	R /	H . R K S	K	V .	

SaSa

Ca2

Ca2 Ca2

	160	170	180
"sw/29/37"	L V K K G D S Y P K L S K S Y V N N K G K E V L V L W G V H		
NJ/11/76	 E N		I .
PR/8/34	. T E . E G	K N	K
sw/Cam/39	. T . . . N	E	N N
sw/NIr1/38	. T	N N	
WSN/33	. T	T N	
FW/50	. T E	N	E
FLW/52	. T E A	A	Q E
QSL/54	. T E A	N	Q E
DEN/57	. T E A	N	R

Sb

SaSaSbSa

SaSa

SaSaSa Ca1

Ca1

	190	200	210
"sw/29/37"	H P P T S T D Q Q S L Y Q N A D A Y V F V G S S K Y N R R F		
NJ/11/76			K .
PR/8/34	. . S N . K . . . N I . . . E N . . . S . V T . N		
sw/Cam/39	. . S N . N N . . T . . H . . N . . . S . V . . N		
sw/NIr1/38	. . S S . N E H . G N . . . S . A . . N		
WSN/33	. . S S . D E S . G N . . . S . A . . N		
FW/50	. . S N I E . . K T I . R K E N . . . S . V . . N		
FLW/52	. . S N I E E . K T . . . K D N . . . S . V . . N		
QSL/54	. . S N I E E . K T . . R K D N . . . S . V . . N		
DEN/57	. . S N I E E . K A . . R K D N . . . S . V . . N		
	SbSb	Sb Sb	Ca1

	220	230	240
"sw/29/37"	T P E I A A R P K A R G Q T G R M N Y Y W T L L E P G D T I		
NJ/11/76	K V . . . A . . . S I		
PR/8/34	 E . . . V . D . A K		
sw/Cam/39	 V . D		
sw/NIr1/38	 V . A . P		
WSN/33	 V K D . H		
FW/50	 E . . . V . . . A . . . I		
FLW/52	 K . . . V . D . P		
QSL/54	 K . . . V . D . P		
DEN/57	 K . . . V . D . S . . . I		
	Ca2Ca2		Ca1

	250	260a	270
"sw/29/37"	T F E A T G N L V A P R Y A F A M N R G S G S G I I T S D A		
NJ/11/76	 V . I W . .		
PR/8/34	I . . . N . . . I L S . . . F		N .
sw/Cam/39	I I . . W L S . . . F		N .
sw/NIr1/38	I I . . W L S . . . F		N .
WSN/33	I I . . W L S . . . F E		N .
FW/50	I . . . N . . . I . . W H . . . L S . . . F		N .
FLW/52	I I . . W L S . . . P		N .
QSL/54	I I . . W L S . . . P		N .
DEN/57	I I . . W L S . . . P		N .

	280															290					300														
"sw/29/37"	P	V	H	D	C	D	T	K	C	Q	T	P	H	G	A	I	N	S	S	L	P	F	Q	N	I	H	P	V	T	I					
NJ/11/76	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
PR/8/34	S	M	.	E	.	N	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
sw/Cam/39	S	M	.	E	.	N	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
sw/NIrl/38	S	M	.	E	.	N	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.				
WSN/33	S	M	.	E	.	N	.	.	.	.	.	.	Q	.	S	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
FW/50	S	M	D	E	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
FLW/52	.	M	D	E	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
QSL/54	.	M	D	E	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
DEN/57	.	L	D	E	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				

	310															320										329									
"sw/29/37"	G	E	C	P	K	Y	V	K	S	T	K	L	R	M	A	T	G	L	R	N	I	P	S	I	Q	S	R	.	.	.					
NJ/11/76	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
PR/8/34	.	.	.	.	.	.	.	R	.	A	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
sw/Cam/39	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
sw/NIrl/38	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
WSN/33	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.				
FW/50	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
FLW/52	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
QSL/54	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
DEN/57	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.				

Abbildung 17: Abgeleitete Aminosäuresequenzen der HA₁ Anteile von Hämagglutininen der Subtypen H1(Hsw1), H1(H0) und H1(H1).

Die Abbildung vergleicht Sequenzdaten von Influenza "A/swine/29/37", A/New Jersey/11/76 (Both et al., 1983), A/PR/8/34 (Winter et al., 1981), A/WSN/33 (Hiti et al., 1981), A/swine/Nordirland/38 und A/swine/Cambridge/38 mit den von Raymond et al. (1986) veröffentlichten Sequenzen von Influenza A (H1N1) Hämagglutininen. Die Referenzsequenz "sw/29/37" ist voll ausgeschrieben; in allen Sequenzen außer "sw/29/37" sind nur veränderte Aminosäuren ausgeschrieben; identische Aminosäuren sind als Punkt dargestellt. Die Deletion der Aminosäuren 131 in WSN/33 und 130 in DEN/57 ist mit Schrägstrichen markiert. Kohlenhydratanheftungsstellen sind eingerahmt. Aminosäuren, die nach Caton et al. (1982) Bestandteile der Antigenorte von A/PR/8/34 sind, sind mit den entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet. Die Nummerierung entspricht Winter et al. (1981).

Eine Sequenzanalyse alter Influenzastämme mit hohen Passagenzahlen, die zudem nicht sehr eng verwandt sind, muß stets als kritisch betrachtet werden, da sich im Lauf vieler Passagen, die häufig die Adaptation an mehrere Wirtssysteme einschlossen, die ursprünglichen Eigenschaften alter Influenzastämme im Labor oft erheblich verändert haben.

Der Vergleich von WSN/33 und NWS/33 zeigte, daß in Sequenzen alter Laborstämme tatsächlich eine hohe Anzahl von Labormutationen erwartet werden muß, die unter Umständen biologische Funktionen oder das antigenetische Verhalten der Stämme modifizieren.

Mutationen in der Nähe der proteolytischen Spaltstelle können z.B. die biologische Aktivierbarkeit in bestimmten Geweben verändern. Die Mutation in 328 von Serin zu Tyrosin, die in WSN/33 dem Arginin, das die HA₁ und HA₂ Untereinheiten verbindet unmittelbar vorausgeht, wurde im Zusammenhang mit der biologischen Aktivierbarkeit von WSN/33 in MDBK Zellen ohne Zusatz von Trypsin (Choppin, 1969) und der Spaltbarkeit durch Plasmin (Lazarowitz et al., 1973) diskutiert (Hiti et al., 1981), da benachbarte Aminosäuren die Spaltung durch Plasmin beeinflussen (Robbins & Summaria, 1970). Auch die Mutationen in 29 (WSN/33 und NWS/33) und 35 (WSN/33) liegen im dreidimensionalen Modell in der Nähe der Spaltstelle zwischen HA₁ und HA₂. Ein Zusammenhang mit den neurotrophen Eigenschaften der beiden Stämme und der veränderten Spaltbarkeit von WSN/33 ist deshalb denkbar, besonders weil die Mutation in 35 zum Verlust der Kohlenhydratanheftungsstelle 33 führt. Der Neurotropismus könnte aber auch durch Mutationen in der Nähe der Rezeptorbindungsstelle ermöglicht werden. Dieser Bereich konnte in dieser Untersuchung nicht überprüft werden.

Austausche von Aminosäuren, die zu antigenetischen Determinanten beitragen, können artefiziell die antigenen Eigenschaften der Stämme modifizieren (Robertson et al., 1987; Oxford et al., 1987; Katz & Webster, 1988). Die Aminosäuren 196 und 198, die in beiden Stämmen unterschiedlich mutiert sind, gehören zum Antigenort Sb (Caton et al., 1982). Die Sequenzunterschiede in diesen Positionen könnten für das unterschiedliche antigenetische Verhalten von WSN/33 und NWS/33 im Hämagglutinationsinhibitionstest mitverantwortlich sein.

Der Stamm WSN/33 hat eine Anzahl von Aminosäureaustauschen und ein Muster von Glykosylierungsstellen erworben, das einzigartig ist und deren Bedeutung unbekannt ist (Hiti et al., 1981).

Die biologische Auswirkung des Befundes, daß WSN/33 die Glykosylierungsstellen in 33 und 289, die in allen publizierten Sequenzen von H1 Hämagglutininen und den hier untersuchten Stämmen konserviert sind, verloren hat, ist nicht bekannt; da WSN/33 jedoch von MDBK Zellen ohne Zusatz von Trypsin in infektiöser Form ausgeschieden wird (Choppin, 1969) und durch Plasmin gespalten wird (Lazarowitz et al., 1973), könnte das Fehlen der Zuckerseitenkette in unmittelbarer Nachbarschaft der Spaltstelle des Vorläuferproteins HA₀ den Zugang für zelluläre Proteasen erleichtern und damit die für die Infektiosität essentielle Spaltung in die Untereinheiten HA₁ und HA₂. Der natürlich vorkommende Influenzastamm

A/chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2) zeigte eine leichtere Spaltbarkeit, verursacht durch den Verlust einer Glykosylierungsstelle in 23, die ebenfalls in der Nähe der Spaltstelle liegt. Diese Veränderung war verbunden mit einer drastischen Virulenzsteigerung (Kawaoka & Webster, 1985; Webster et al., 1986).

Eine Beeinflussung des antigenetischen Verhaltens von WSN/33 durch die Verschiebung einer Glykosylierungsstelle von 131 nach 129 ist denkbar (Stevens et al., 1987), denn die Anheftungsstelle kommt dadurch direkt in die antigenetische Region Sa zu liegen.

In den Aminosäuresequenzen der europäischen Schweineinfluenzähämagglutinine A/swine/Nordirland/38 und A/swine/Cambridge/39 liegen Bereiche, die stärker von den Sequenzen klassischer Schweineinfluenzavirus Hämagglutinine abweichen, als die Sequenz der gesamten HA₁ Anteile. Einige dieser Mutationsanhäufungen überschneiden sich mit antigenetisch relevanten Anteilen des HA₁ Moleküls (Caton et al., 1982; Concannon et al., 1984) und fungieren möglicherweise ebenfalls als antigenetische Determinanten.

Die Bedeutung von Mutationsanhäufungen, die ohne Beziehung zu bekannten hypervariablen Regionen sind, ist schwer zu interpretieren. Es ist nicht anzunehmen, daß sie zufällig sind, da sie dann gleichmäßiger in der Sequenz verteilt liegen müßten. Eine Korrelation mit biologischen Funktionen kann jedoch nur vermutet werden.

Die Aminosäuren 91 und 92, die in der Mutationsanhäufung von 91-96 liegen, tragen in antigenetischen Varianten von H3 Stämmen Austausch. Die Glykosylierungsstelle 94a, die in den klassischen Schweineinfluenzastäm-

men vorkommt, fehlt in den anderen analysierten Sequenzen. Sie kommt jedoch in den Hämagglutininen der H1(H1) Stämme nach 1950 (Abb. 17) wieder vor (Raymond et al., 1986). In unmittelbarer Nähe dieses Bereiches befindet sich die Aminosäure 98, die an der Bindung des Rezeptors beteiligt ist (Weis et al., 1988).

Die Aminosäuren 224 und 225 der Anhäufung 223-227 sind von Caton et al. (1982) als Antikörperbindungsstelle vorgeschlagen. Die Sequenz liegt am Rand der Rezeptorbindungstasche. Die Aminosäuren 226 und 228 interagieren direkt mit dem Rezeptoranalogue (Weis et al., 1988).

Die Aminosäuren 260-264 liegen in zweiter Reihe hinter der Aminosäure 98, die eine Rolle bei der Rezeptorbindung spielt (Weis et al., 1988). Alle Mutationsanhäufungen, deren Bedeutung unbekannt ist, liegen also in der Umgebung der Rezeptorbindungstasche. Sie stehen deshalb möglicherweise mit einer Adaptation humaner Hämagglutinine an Wirtszellrezeptoren im Schwein in Verbindung.

Veränderungen des Glykosylierungsmusters können zu antigenetischer Konservierung bzw. Variation beitragen (Air & Laver, 1986) indem sie antigenetische Determinanten maskieren (Verhoeven et al., 1980; Wilson et al., 1981; Wiley et al., 1981). Die Aminosäuren 166 bis 168 natürlich vorkommender H3 Hämagglutinine (1968 bis 1982) und mit monoklonalen Antikörpern selektierter Varianten blieben unverändert, da eine Zuckerseitenkette in 165 den Zugang für Antikörper blockiert (Air & Laver, 1986). H1(H1) Influenzastämme sind in 163 glykosyliert und auch hier variiert der Antigenort Sa nur wenig (Raymond et al., 1986).

Die Aminosäuren der Anheftungsstelle 165 von sw/Cam/39 und sw/NIrl/38 liegen ebenfalls in der antigenetischen Bindungsstelle Sa. Eine Kohlenhydratseitenkette in dieser Position könnte diese antigenetische Determinante sehr leicht maskieren. Der Sequenzvergleich mit WSN/33 und PR/8/34 läßt die Interpretation zu, daß diese Glykosylierungsstelle auch in diesen beiden Stämmen vorhanden war, aber sekundär durch eine sequenzielle Mutation im Triplet 165 von WSN/33, bzw. durch eine zusätzliche Mutation in PR/8/34 verloren ging. Eine sichere Interpretation dieses Befundes ist jedoch schwierig, weil 165 in den hier analysierten Sequenzen hypervariabel ist, in allen H1(H1) Hämagglutininen, die ab 1950 isoliert wurden, aber konserviert, und zwar als Serin, wie in der Referenzsequenz. Da PR/8/34 keine Glykosylierungsstelle in dieser Region besitzt, zeigten Varianten, die mit monoklonalen Antikörpern selektiert worden waren, Austausch der Aminosäuren 165, 166 und 167 (Caton et al., 1982).

Zusätzliche Kohlenhydratseitenketten, die im Lauf der Antigendrift eingeführt werden, können demnach Antikörperbindungsstellen des Hämagglutinins abschirmen. Dabei könnten sie durch ihre Größe wirkungsvoller sein als einzelne Aminosäureaustausche. Da die Rezeptortasche umgeben ist von Antikörperbindungsstellen, können Kohlenhydratseitenketten in bestimmten Positionen gleichzeitig Antikörperbindung und Rezeptorbindung beeinflussen. Dies ist sogar durch einzelne Aminosäureaustausche möglich (Kilbourne et al., 1979, 1983; Both et al., 1983; Deom et al., 1986; Underwood et al., 1987). Die Kohlenhydratanheftungsstelle 131 in PR/8/34 und sw/Cam/39 befindet sich gleichzeitig in der Nähe des Antigenortes Sa (Caton et al., 1982) und in der Nähe der Rezeptorbindungsstelle (Wilson et al., 1981; Weis et al., 1988), weshalb beide Funktionen beeinflusst werden könnten, zumal die Aminosäuren 134 bis 137 direkt mit einem Rezeptoranalogue interagierten (Weis et al., 1988). Das Gleichgewicht zwischen Nachteil durch sterische Behinderung der Rezeptorbindung und Vorteil durch Abschirmung antigenetischer Bindungsstellen durch Kohlenhydratseitenketten könnte evolutionäre Bedeutung haben. Bei starkem Selektionsdruck durch eine hohe Populationsimmunität ist unter Umständen der Nachteil einer verminderten Rezeptorbindung gering, verglichen mit dem Vorteil der Maskierung antigenetischer Bindungsstellen, durch die das Virus sich der Neutralisation durch Antikörper entziehen kann. Auffällig ist jedenfalls, daß WSN/33 und PR/8/34 vermutlich im Lauf von Laborpassagen Glykosylierungsstellen wieder verloren haben, daß kein humaner H1 Influenzastamm bekannt ist, dessen Hämagglutinin weniger Glykosylierungsstellen besitzt als WSN/33 und PR/8/34, daß die Anzahl der Glykosylierungsstellen innerhalb des H1 Subtyps im Laufe der Antigendrift tendenziell zunimmt, und daß die wenigsten Glykosylierungsstellen (keine Glykosylierungsstellen im Kopfteil, der die Antikörperbindungsstellen trägt) in den Hämagglutininen klassischer Schweineinfluenzaviren vorkommen, die einem ausgesprochen geringen Selektionsdruck durch Antikörper ausgesetzt sind.

Im Hämagglutinationsinhibitionstest verhalten sich sw/N1rl/38 und sw/Cam/39 anders als Isolate klassischer Schweineinfluenzaviren, was angesichts der homogenen antigenetischen Eigenschaften der klassischen Schweineinfluenzaviren (Meier-Ewert et al., 1970) bereits als Hinweis auf einen anderen Ursprung gewertet werden kann. Da die Evolutionslinien

aller H1N1 Viren seit 1918 mit großer Sicherheit divergierende Zweige eines gemeinsamen Stammes sind, reagieren die europäischen Isolate im HI am deutlichsten mit dem ältesten untersuchten Stamm bzw. Antiserum klassischer Schweineinfluenzaviren.

Zwar steht sw/Cam/39 in seinem antigenetischen Verhalten keinem Zweig der hier untersuchten H1 Hämagglutinine besonders nahe (der Stamm reagiert mit allen Hyperimmunseren zu gleichen oder niedrigeren Titern als sw/N1rl/38). Der monoklonale Antikörper H2 gegen das Hämagglutinin von A/Brazil/11/78 verbindet aber die Hämagglutinine von sw/Cam/39, FM/1/47 und Brazil/11/78. Damit steht sw/Cam/39 dem Evolutionszweig, der zur Entwicklung der H1(H1) Stämme von 1946 und 1977 führte, relativ näher als sw/N1rl/38.

Sowohl die Anzahl als auch die Art der Aminosäureaustausche in sw/N1rl/38 und sw/Cam/39 deuten darauf hin, daß die Hämagglutinine der europäischen Schweineinfluenzastämme einem anderen Evolutionszweig entstammen, als dem der klassischen Schweineinfluenzavirus Hämagglutinine. Die ausgeprägten Homologien zu WSN/33 und PR/8/34 zeigen weiterhin, daß sw/N1rl/38 und sw/Cam/39 den humanen Stämmen ähnlicher sind, als den klassischen Schweineinfluenzaviren.

Die Untersuchung der Sequenzhomologien und Aminosäureaustausche bestätigte, daß die europäischen Schweineinfluenzaviren zwischen WSN/33 und PR/8/34 stehen, wobei sie wiederum WSN/33 näher stehen als PR/8/34. Nach einem hypothetischen Stammbaum (Abb. 16) zweigt sw/Cam/39 schon zu einem relativ frühen Entwicklungszeitpunkt ab, deshalb ist es denkbar, daß das Epitop des monoklonalen Antikörpers H2 in PR/8/34, sowie in sw/N1rl/38 und WSN/33 unabhängig voneinander verändert, aber in sw/Cam/39 noch erhalten ist. Es gibt mehrere Beispiele für solche Austausche z.B. 198 im Antigenort Sb, oder 227 (Abb. 12). In den von Caton et al. (1982) definierten Aminosäuren, die Bestandteile antigenetischer Determinanten sind, findet sich dennoch kein möglicher Beleg für diese Erklärung, denn die genannten Aminosäuren sind in den Stämmen nach 1950 oder 1977 nicht konserviert, sondern ebenfalls verändert. Daher ist vielleicht eine zufällig gleiche Nebenmutation in sw/Cam/39 im Epitop des monoklonalen Antikörpers H2 für diese Beobachtung verantwortlich. Zum Beispiel ist die Aminosäure 193 des Antigenortes Sb in sw/Cam/39 und fast allen H1(H1) Hämagglutininen Threonin, aber in den H1(H0) Stämmen und in sw/N1rl/38 Serin oder Asparagin.

Das Elternvirus von sw/N1rl/38 muß WSN/33 unmittelbar vorausgegangen sein, denn sw/N1rl/38 besitzt nur wenige Nebenmutationen, die in WSN/33 nicht vorkommen. Viele Mutationen von sw/Cam/39 findet man hingegen in keiner bekannten Sequenz von H1 Hämagglutininen wieder.

Vom gegenwärtigen Standpunkt aus kann nicht entschieden werden, ob das Hämagglutinin von sw/Cam/39 diese Entwicklung in der Wirtsspezies Schwein durchgemacht hat, oder ob es einen noch unbekannten Evolutionsweg humaner H1 Hämagglutinine nachzeichnet. Diese Erklärung wäre denkbar nach dem Modell für die Evolutionsstammbäume von Influenza A, B, und C Viren (Buonagurio et al., 1985; Yamashita et al., 1988) und dem Befund, daß die Evolutionslinien, denen WSN/33 und PR/8/34 entstammen, weiter auseinander liegen als die von sw/N1rl/38 bzw. sw/Cam/39 und WSN/33 oder PR/8/34.

Das Jahr 1937 wurde in England und Wales als ein Jahr hoher Influenzaaktivität mit 450 Todesfällen/Mio. Einwohner dokumentiert (Stuart-Harris et al., 1985), deshalb ist die Möglichkeit gegeben, daß zu diesem Zeitpunkt humane Influenzaviren auf Schweine übertragen wurden. Die Zahl der Mutationen in sw/N1rl/38 und sw/Cam/39 entspricht aber etwa der in WSN/33 und PR/8/34, so daß die humanen Influenzaviren, von denen sw/N1rl/38 und sw/Cam/39 abstammen, vermutlich etwa zur gleichen Zeit wie WSN/33 und PR/8/34 zirkuliert sind, denn wären sw/N1rl/38 und sw/Cam/39 Abklatschisolate humaner Stämme, die um 1937 im Menschen zirkuliert sind, so müßte man, legt man die Mutationsrate humaner Hämagglutinine von 9.5 bis 12.0 % in 10 Jahren (Verhoeven et al., 1980; Raymond et al., 1986) zugrunde, zwischen 12 und 16 zusätzliche Aminosäureaustausche erwarten.

Wegen der Ähnlichkeit von sw/N1rl/38 und WSN/33 und der geringen Anzahl von Nebenmutationen muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß sw/N1rl/38 eine Kontamination mit einem Laborstamm (WS/33, NWS/33 oder WSN/33) sein könnte. Vor 1938 und von 1939 bis 1979 gab es bis auf eine Ausnahme (Harnach et al., 1950) keine Anzeichen für das Auftreten von Schweineinfluenza in Europa. Es ist deshalb recht unwahrscheinlich, daß in zwei aufeinanderfolgenden Jahren so verschiedene Stämme im Schwein zirkulieren, wie sw/N1rl/38 und sw/Cam/39.

Webster et al. (1982) hatten bei einer Analyse der N-terminalen Anfangsequenzen der Signalpeptide und HA₁ Untereinheiten mehrerer humaner, aviärer und porciner Influenza A H1 Hämagglutinine festgestellt, daß in

diesem Bereich duck/Alberta/35/76 näher mit den humanen Stämmen Bel/42, Loyang/4/57, USSR/90/77 und FW/1/50 verwandt ist, als mit früheren humanen H1 Hämagglutininen (1933-35) oder klassischen Schweineinfluenzähämagglutininen (1930, 1976). Es war daher von Interesse, ein aviäres H1(Hsw1) Hämagglutinin in die vorliegende Untersuchung mit einzuschließen. Eine partielle Sequenzanalyse des Hämagglutinins von dk/Alb/35/76 (Ergebnis nicht gezeigt) ergab jedoch keine unmittelbare Verwandtschaft mit einer der hier analysierten oder einer der publizierten Sequenzen (Daniels et al., 1985; Raymond et al., 1986; Stevens et al., 1987) von H1 Hämagglutininen. Ein Zusammenhang mit humanen oder klassischen Schweineinfluenzavirus Hämagglutininen erscheint deshalb im Augenblick nicht wahrscheinlich.

Obwohl keinerlei Hinweise auf ein animalisches Reservoir existieren, ist es unwahrscheinlich, daß die plötzliche Veränderung der Antigenität humaner H1 Hämagglutinine von H1(H0) zu H1(H1) im Jahr 1946 im Menschen vor sich gegangen ist. Der Ursprung der H1(H1) Stämme ist bis heute unklar. In dieser Arbeit wurde versucht, den Evolutionsweg humaner H1 Hämagglutinine (Raymond et al., 1986) aus dem Blickwinkel der H1(Hsw1) Hämagglutinine nachzuvollziehen.

In Relation zur Referenzsequenz "sw/29/37" folgt die Verteilung der Austausche im HA₁ Anteil der H1(H1) Hämagglutinine einem anderen Muster als in WSN/33, PR/8/34, sw/N1rl/38, sw/Cam/39 oder NJ/11/76. Viele Aminosäuren, die in den H1(H0) Stämmen noch konserviert waren, sind in den Stämmen nach 1950 mutiert. Dies kann auf eine fortschreitende Antigendrift zurückgeführt werden.

Von 1950 bis 1957 werden mehrere Rückmutationen in den H1(H1) Hämagglutininen beobachtet. Die Tatsache, daß relativ häufig Rückmutationen vorkommen erklärt sich wahrscheinlich so, daß an bestimmten Aminosäurepositionen nur eine begrenzte Anzahl von Austauschen möglich ist, die keinen Selektionsnachteil darstellen. Vermutlich werden aus dem gleichen Grund mit monoklonalen Antikörpern häufig unabhängig voneinander gleiche Austausche selektiert (Caton et al., 1982; Nakajima et al., 1983; Jackson & Nestorowicz, 1985).

Die Aminosäuren, die in den H1(H0) Stämmen mutiert waren, aber in den H1(H1) Stämmen wieder, oder noch konserviert sind, könnten ebenfalls als Rückmutationen aus der Zeit zwischen 1934 und 1950 interpretiert werden. Auffällig ist aber, daß ein Teil der Aminosäureaustausche, die beim Ver-

gleich von "sw/29/37", PR/8/34, WSN/33, sw/N1rl/38 und sw/Cam/39 als Nebenmutationen von PR/8/34 beschrieben wurden, in den H1(H1) Hämagglutininen ab dem ersten untersuchten Stamm (FW/1/50) als Hauptmutationen auftreten, denn dies deutet an, daß die H1(H1) Stämme nach 1946 aus einem unbekannten Evolutionszweig von Hämagglutininen des Subtyps H1 kommen, der PR/8/34 näher stand als WSN/33.

Auch in seinen antigenetischen Eigenschaften steht der H1(H1) Stamm FM/1/47 PR/8/34 relativ näher als WSN/33, da das Antiserum gegen PR/8/34 mit allen untersuchten Stämmen zu niedrigeren Titern reagiert als das Antiserum gegen WSN/33, außer mit FM/1/47.

Die Inhibition von FM/1/47 und sw/29/37 durch den monoklonalen Antikörper H198 gegen das Hämagglutinin von PR/8/34 deutet ebenfalls auf die serologische Verwandtschaft der H1(H1) Stämme mit PR/8/34. Das Epitop des monoklonalen Antikörpers H198 ist in den anderen H1(H0) Stämmen und in den Schweineinfluenzastämmen nach 1937 so verändert, daß es nicht mehr erkannt wird. Dies bedeutet möglicherweise, daß FM/1/47 aus einem Reservoir kommt, in dem Varianten konserviert waren, die PR/8/34 ähnlicher waren als WSN/33.

Der Stamm Brazil/11/78 war zusammen mit Lackland/3/78 die erste Variante, die nach dem Wiederauftreten der H1N1 Stämme 1977 eine deutliche Veränderung der Antigenität aufwies. Da H22 der einzige monoklonale Antikörper gegen Brazil ist, der mit FM/1/47 nicht mehr reagiert, sind wahrscheinlich an diesem Epitop Aminosäuren beteiligt, die für diese Antigendrift verantwortlich sind.

Die Aminosäuresequenzhomologie von 80.36 % zwischen "sw/29/37" und USSR/90/77 bzw. dessen Gegenstück FW/1/50 entspricht etwa den mit PR/8/34 und WSN/33 beobachteten Homologien von 83.43 % und 81.28 %. Da mit fortschreitender Antigendrift die Sequenzhomologien gewöhnlich kontinuierlich abnehmen, ist die Homologie von USSR/90/77 und "sw/29/37" auf den Zeitabstand bezogen ungewöhnlich hoch. Dieser Befund deutet an, daß die H1(H1) Stämme 1946 und 1977 vielleicht aus einem unbekannten Reservoir oder einem unbekannten Evolutionszweig kamen und nicht linear durch Antigendrift über die H1(H0) Hämagglutinine aus den H1(Hsw1) Stämmen hervorgegangen sind.

Die große Anzahl von Hauptmutationen zwischen den H1(H0) und H1(H1) Hämagglutininen, sowie die Aminosäuren, die in den H1(H0) Stämmen ausgetauscht sind, in den H1(H1) Stämmen aber wieder/noch konserviert sind,

lassen sowohl die Erklärung zu, daß die H1(H1) durch lineare Antigen-drift aus H1(H0) Stämmen hervorgegangen sind, als auch, daß die Stämme aus einem unbekannten Zweig von H1 Hämagglutininen kommen. Aminosäuren, die in WSN/33, sw/N1rl/38 und sw/Cam/39 konserviert sind, aber identisch mutiert in PR/8/34 und den H1 Stämmen nach 1946, zeigen, daß die Evolutionslinie, die zu den H1(H1) Stämmen führt, PR/8/34 näher steht als WSN/33. Die abrupt veränderte Antigenität der Stämme nach 1946 (Davenport et al., 1960; Scholtissek et al., 1977) spricht nicht für die Theorie, die H1(H1) Stämme seien durch lineare Antigendrift aus den H1(H0) Stämmen hervorgegangen. Eine mögliche Erklärung ist, daß ein bisher unbekanntes menschliches oder animalisches Reservoir existiert, aus dem von Zeit zu Zeit alte konservierte Stämme auftauchen. Die Existenz eines Reservoirs wurde immer wieder diskutiert (Davenport, 1977), besonders im Zusammenhang mit dem Auftreten der H1N1 Stämme 1977 (Nakajima et al., 1978). Falls die Aminosäuren, die in den H1(H0) Stämmen mutiert, in den H1(H1) Stämmen aber wieder konserviert sind, nicht als lauter Rückmutationen erklärt werden sollen, muß diese Evolutionslinie bereits vor 1933/34 abgezweigt sein.

Es gibt bisher keinen Beweis, daß die zahlreichen Varianten eines Subtyps, die über verschiedene Jahren vorkommen, alle einen punktuellen Ursprung haben (Stuart-Harris et al., 1985).

Die Isolierungen "anachronistischer" Stämme (van Rooyen et al., 1949; Nakajima et al., 1979; Moore et al., 1981), von denen allerdings bisher keine Sequenzdaten verfügbar sind, deuten an, daß die Evolution von H1 Influenzaviren im Menschen möglicherweise nicht streng nach dem vom Yamashita et al. (1988) beschriebenen linearen Schema verläuft, sondern, daß auch ältere Varianten zirkulieren, die allerdings nur sehr selten in Erscheinung treten, vielleicht, weil sie von Varianten mit größerem epidemischen Potential zurückgedrängt werden.

1986 wurden von einem immunsupprimierten Patienten über einen Zeitraum von 2 Wochen fünf Stämme eines H1(H1) Influenzavirus isoliert, die im HI Test die größte Übereinstimmung mit A/USSR/90/77 zeigten. Eine partielle Sequenzanalyse ergab, daß auch die Nukleotidsequenz des HA₁ Anteils von allen bekannten Nukleotidsequenzen von H1 Hämagglutininen USSR/90/77 am nächsten steht (Müller, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine Konservierung von Stämmen im Menschen über Zeiträume von mehreren Jahren scheint daher grundsätzlich möglich zu sein.

Zur Evolution (linear/verzweigt) der klassischen Schweineinfluenzaviren liegen bisher keine umfassenden Untersuchungen vor, deshalb ist die Zahl der analysierten Sequenzen zu gering, um eine Aussage über das Schema, nach dem die Evolution der klassischen H1N1 Schweineinfluenzaviren verläuft, machen zu können. Hinshaw et al. (1978b) zeigten, daß Schweineinfluenzaisolate trotz konservierter Antigenität genetisch sehr heterogen sein können. Die Antigenität von H3 Hämagglutininen aus Schweinen weicht ebenfalls weniger voneinander ab, als die zahlreichen Nukleotidaustausche vermuten ließen (Nakajima et al., 1982).

Bei den hier untersuchten Stämmen scheint ein Bezug zu den Zeitpunkten der Isolierung gegeben zu sein, da sich die Zahl der Mutationen mit wachsendem zeitlichen Abstand der Isolierungen erhöht. Sw/Ia/15/30 und sw/29/37 wurden im Abstand von sieben Jahren isoliert und unterscheiden sich von Triplet 52 bis 92 in drei Nukleotiden und einer Aminosäure. Im gleichen Teilstück differieren NJ/11/76 und sw/29/37, die im Abstand von 39 Jahren isoliert wurden, in 18 Nukleotiden und 6 Aminosäuren. Zwei der drei Nukleotidaustausche zwischen sw/Ia/15/30 und sw/29/37 kommen auch in NJ/11/76 vor. Das deutet auf eine teilweise lineare Verwandtschaft zwischen diesen drei Stämmen. Die dritte Nukleotidmutation kommt in NJ/11/76 nicht vor. Sie führt im Hämagglutinin von sw/29/37 zum Austausch der Aminosäure 82 im Antigenort Cb (Caton et al., 1982).

In der Wirtsspezies Schwein ist der Selektionsdruck durch Antikörper niedrig, da die durchschnittliche Lebensdauer kurz und der Anteil juveniler, voll empfänglicher Tiere an der Population stets hoch ist. Darüberhinaus tragen eine Ausscheidungsdauer bis zu vier Monaten (Blaskovic et al., 1970) und Schweine die nach einer Erstinfektion mit Influenza möglicherweise persistierend infiziert bleiben (Nakamura et al., 1972), zur Konservierung der Antigenität von Schweineinfluenzaviren bei. Die antigenetischen Merkmale von Influenzaviren die sich im Schwein vermehren (H1N1, H3N2) verändern sich deshalb nur sehr langsam (Meier-Ewert et al., 1970; Nakajima et al., 1982).

Die Aminosäuremutationen, die zwischen den Hämagglutininen von sw/Ia/15/30, "sw/29/37" und NJ/11/76 beobachtet wurden, sind ohne sichtbare Beziehung zu bekannten Antigenorten anscheinend zufällig in der HA₁

Untereinheit des Hämagglutinins verteilt. Auch im Fehlen von Kohlenhydratseitenketten im Kopfteil des Moleküls, der die antigenetischen Determinanten enthält, könnte der niedrige Antikörperdruck in der Wirtsspezies Schwein Ausdruck finden, da die Abdeckung antigenetischer Bindungsstellen hier keinen evolutionären Vorteil bedeuten würde.

Die Anzahl von 3.7 Nukleotidaustauschen pro Aminosäureaustausch weist auf eine Evolution, bei der Aminosäuremutationen mit keinem Selektionsvorteil, oder sogar mit einem Nachteil verbunden sind.

Insgesamt ergibt sich für die Aminosäuresequenzen der Hämagglutinine klassischer Schweineinfluenzaviren eine Variation von 2.1 % in 10 Jahren. Damit bleibt sie weit unter den für HA₁ Untereinheiten humaner Influenza A Stämme errechneten Werten von 9.5 % (Verhoeven et al., 1980) oder 12 % (Raymond et al., 1986).

Dieser Vergleich setzt allerdings eine im wesentlichen lineare Evolution der Schweineinfluenzaviren voraus, denn nur in diesem Fall ist die Zahl der Austausche dem zeitlichen Abstand der Isolierungen proportional. Falls wie bei den humanen Influenza B und C Viren mehrere Evolutionslinien kozyklulieren können nahe verwandte Stämme oft in erheblichen Zeitabständen isoliert werden.

Die Schweineinfluenzavirusstämme A/swine/Nordirland/38 (H1N1) und A/swine/Cambridge/39 (H1N1) wurden im Hämagglutinationsinhibitionstest (HI) mit Kaninchen- und Frettchenhyperimmunsere und monoklonalen Antikörpern untersucht. Die beiden Stämme verhielten sich im HI unterschiedlich, aber keiner konnte aufgrund seiner phänotypischen antigenen Merkmale der sonst überaus homogenen Gruppe klassischer Schweineinfluenzaviren (H1N1) zugeordnet werden.

Um die Stellung der Hämagglutinine von sw/NIrl/38 und sw/Cam/39 innerhalb der großen Gruppe der Hämagglutinine vom Subtyp H1 weiter zu untersuchen, wurden mit der Methode der direkten RNA Sequenzierung (Kettenabbruchsreaktion) die Nukleotidsequenzen der Stämme sw/NIrl/38, sw/Cam/39 und sw/29/37 (ein klassischer Schweineinfluenzastamm) bestimmt, die die HA₁ Untereinheit des Hämagglutinins kodieren. Die erhaltenen Nukleotid- und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mit den veröffentlichten Sequenzdaten von A/PR/8/34, WSN/33 und NJ/11/76 verglichen, wobei sw/29/37 als Referenzsequenz diente. Diese Untersuchung ergab, daß die Hämagglutinine der europäischen Schweineinfluenzaviren enger mit frühen humanen H1N1 Stämmen verwandt sind, als mit Stämmen klassischer Schweineinfluenzaviren.

Im Unterschied zu den klassischen Schweineinfluenzavirus Hämagglutininen sind die Nukleotid- und Aminosäuremutationen in sw/NIrl/38 und sw/Cam/39 in hypervariablen Regionen angeordnet, ähnlich wie die Mutationen in PR/8/34 und WSN/33.

Etwa die Hälfte der Austausche im Hämagglutinin der europäischen Schweineinfluenzaviren ist identisch mit Austauschen, die in den humanen Stämmen vorkommen.

Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den europäischen Schweineinfluenzaviren und den humanen Stämmen ließen folgende Verwandtschaftsbeziehungen erkennen: die Hämagglutinine der europäischen Schweineinfluenzastämme sw/NIrl/38 und sw/Cam/39 haben sich mit großer Sicherheit aus Hämagglutininen humaner Influenzastämme entwickelt, die näher mit WSN/33 verwandt waren, als mit PR/8/34. Dabei stammt sw/Cam/39 von einem noch älteren Stamm als sw/NIrl/38, dessen Elternvirus dem Stamm WSN/33 unmittelbar vorausgegangen sein muß.

Während fast alle Austausche in sw/NIrl/38 auch in WSN/33 vorkommen, findet man viele Mutationen von sw/Cam/39 in keiner veröffentlichten Sequenz wieder. Die Frage, ob diese Mutationen in der Wirtsspezies Schwein erworben wurden, oder ob sw/Cam/39 einen unbekannten Zweig humaner H1 Hämagglutinine widerspiegelt, kann aus den vorliegenden Daten nicht beantwortet werden.

Summary

Investigations on the relationships of the European swine influenza viruses A/swine/Northern Ireland/38 and A/swine/Cambridge/39 to porcine and human H1N1 virus strains.

The swine influenza viruses A/swine/Northern Ireland/38 (H1N1) and A/swine/Cambridge/39 (H1N1) were analyzed in haemagglutination inhibition assays using rabbit and ferret hyperimmunsera and monoclonal antibodies. The strains were antigenically distinct from one another and from isolates of classical swine influenza (H1N1).

To further investigate the position of sw/NIrl/38 and sw/Cam/39 within the H1 subtype, the nucleotide sequences coding for the HA₁ portion of the haemagglutinins of the strains sw/NIrl/38, sw/Cam/39 and sw/29/37 (a strain of classical swine influenza) were determined, using the dideoxy-chain-terminating procedure for direct RNA sequencing. The obtained nucleotide sequences and their deduced amino acid sequences were compared with the published sequence data of A/PR/8/34, A/WSN/33 and A/NJ/11/76, using sw/29/37 as reference sequence. Sequence analysis of the haemagglutinins of these European strains of swine influenza revealed a closer relationship to early human H1N1 isolates than to strains of classical swine influenza.

The nucleotide and amino acid changes in sw/NIrl/38 and sw/Cam/39 are clustered in hypervariable regions, similar to the pattern observed in PR/8/34 and WSN/33, but fundamentally different from the mutations observed in NJ/11/76.

The changes observed between the haemagglutinins of the human strains and the European swine influenza strains provide strong evidence suggesting that sw/NIrl/38 and sw/Cam/39 originate from strains of human H1 influenza viruses, more closely related to ancestor strains of WSN/33 than of PR/8/34.

Sw/Cam/39 has almost certainly originated from even an earlier human strain than sw/NIrl/38, whose parent strain must have preceded WSN/33 directly. Accordingly sw/NIrl/38 shares most of its changes with WSN/33, whereas many changes of sw/Cam/39 are observed in no published sequence of other haemagglutinins of the H1 subtype. It cannot be decided from

the present point of view, whether sw/Cam/39 has evolved in swine, or whether it reflects an unknown evolutionary pathway of H1 haemagglutinins in humans.

Air, G. M., 1979:

Nucleotide sequence coding for the "signal peptide" and N terminus of the hemagglutinin from an asian (H2N2) strain of influenza virus.

Virology 97, 468-472

Air, G. M., 1981:

Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza virus.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7639-7643

Air, G. M., J. Blok, R. M. Hall, 1981:

Sequence relationships in influenza viruses.

In: The replication of negative strand viruses. Bishop, D. H. L., R. W. Compans (Hrsg.), Elsevier North Holland, 225-239

Air, G. M., W. G. Laver, 1986:

The molecular basis of antigenic variation in influenza virus.

Adv. Vir. Res. 31, 53-102

Andrewes, C. H., P. P. Laidlaw, W. Smith, 1935:

Influenza: observations on the recovery of virus from man and on the antibody content of human sera.

Brit. J. Exp. Path. 16, 566-582

Anonymus, 1971:

A revised system of nomenclature for influenza viruses.

Bull. Wld. Hlth. Org. 45, 119-124

Anonymus, 1979:

Reconsideration of influenza A virus nomenclature: a WHO memorandum.

Bull. Wld. Hlth. Org. 57, 227-233

Anonymus, 1980:

A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum.

Bull. Wld. Hlth. Org. 58, 585-591

Arikawa, J., N. Yamane, T. Odagiri, N. Ishida, 1979:

Serological evidence of H1 influenza virus infection among Japanese hogs.

Acta Virol. 23, 508-511

Arikawa, J., N. Yamane, K. Totsukawa, T. Odagiri, N. Ishida, 1983:

Antigenic and genetic characterization of H1 influenza viruses isolated from feral ducks and swine in Japan.

Arch. Virol. 78, 19-27

Baez, M., P. Palese, E. D. Kilbourne, 1980:

Gene composition of high-yielding influenza vaccine strains obtained by recombination.

J. Infect. Dis. 141, 362-365

Bean, W. J., Jr., N. J. Cox, A. P. Kendal, 1980:

Recombination of human influenza A viruses in nature.

Nature 284, 638-640

Bean, W. J., 1984:

Correlation of influenza A virus nucleoprotein genes with host species.

Virology 133, 438-442

Beveridge, W. I. B., 1977:

Influenza: the last Great Plague.

Heinemann Educational Books Ltd., London.

Blakemore, F., A. W. Gledhill, 1941:

Some observations on an outbreak of swine influenza in England.

Vet. Rec. 53, 227-230

Blakemore, F., A. W. Gledhill, R. E. Glover, E. L. Taylor, 1941:
Discussion on swine influenza in the British Isles.
Proc. Roy. Soc. Med. 34, 611-618

Blaskovic, D., V. Rathova, R. Sboda, D. Kociskova, M. M. Kaplan, 1970:
Experimental infection of weanling pigs with A/swine influenza virus. 2.
The shedding of virus by infected animals.
Bull. Wld. Hlth. Org. 42, 767-770

Both, G. W., M. J. Sleigh, 1981:
Conservation and variation in the hemagglutinins of Hong Kong subtype
influenza viruses during antigenic drift.
J. Virol. 39, 663-672

Both, G. W., C. H. Shi, E. D. Kilbourne, 1983:
Hemagglutinin of swine influenza virus: A single amino acid change plei-
otropically affects viral antigenicity and replication.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6996-7000

Buckler-White, A. J., B. R. Murphy, 1986:
Nucleotide sequence analysis of the nucleoprotein gene of an avian and a
human influenza virus strain identifies two classes of nucleoproteins.
Virology 155, 345-355

Buonagurio, D. A., S. Nakada, U. Desselberger, M. Krystal, P. Palese,
1985:
Noncumulative changes in the hemagglutinin genes of influenza C virus
isolates.
Virology 146, 221-232

Butterfield, W. K., C. H. Campbell, R. G. Webster, K. F. Shortridge,
1978:
Identification of a swine influenza virus (Hsw1N1) isolated from a duck
in Hong Kong.
J. Inf. Dis. 138, 686-689

Campbell, D., C. Sweet, H. Smith, 1979:

Comparisons of virulence of influenza virus recombinants in ferrets in relation to their behaviour in man and their genetic constitution.

J. gen. Virol. 44, 37-44

Caton, A. J., G. G. Brownlee, J. W. Yewdell, W. Gerhard, 1982:

The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype).

Cell 31, 417-427

Chang, W. K., 1969:

National influenza experience in Hong Kong, 1968.

Bull. Wld. Hlth. Org. 41, 349-351

Choppin, P. W., 1969:

Replication of influenza virus in a continuous cell line: high yield of infective virus from cells inoculated at high multiplicity.

Virology 39, 130-134

Concannon, P., I. W. Cummings, W. A. Salser, 1984:

Nucleotide sequence of the influenza virus A/USSR/90/77 hemagglutinin gene.

J. Virol. 49, 276-278

Cox, N. J., A. P. Kendal, 1984:

Genetic stability of A/Ann Arbor/6/60 cold-mutant (temperature sensitive) live influenza virus genes: Analysis by oligonucleotide mapping of recombinant vaccine strains before and after replication in volunteers.

J. Infect. Dis. 149, 194-200

Daniels, R. S., A. R. Douglas, J. J. Skehel, M. D. Waterfield, J. A. Wilson, D. C. Wiley, 1983a:

Studies on the influenza virus hemagglutinin in the ph 5-conformation.

In: The origin of pandemic influenza viruses. Laver, W. G. (Hrsg.), Elsevier, New York, 1-7

Daniels, R. S., A. E. Douglas, J. J. Skehel, D. C. Wiley, 1983b:
Analyses of the antigenicity of influenza hemagglutinin at the pH optimum for virus-mediated membrane fusion.

J. Gen Virol. 64, 1657-1662

Daniels, R. S., A. R. Douglas, J. J. Skehel, D. C. Wiley, 1985:
Antigenic and amino acid sequence analysis of influenza viruses of the H1N1 subtype isolated between 1982 and 1984.

Bull. Wld. Hlth. Org. 63, 273-277

Daniels, R. S., S. Jeffries, P. Yates, G. C. Schild, G. N. Rogers, J. C. Paulson, S. A. Wharton, A. R. Douglas, J. J. Skehel, D. C. Wiley, 1987:
The receptor-binding and membrane-fusion properties of influenza virus variants selected using anti-haemagglutinin monoclonal antibodies.

EMBO J. 6, 1459-1465

Davenport, F. M., R. Rott, W. Schäfer, 1960:

Physical and biological properties of influenza virus components obtained after ether treatment.

J. Exp. Med. 112, 767-782

Davenport, F. M., E. Minuse, A. V. Hennessy, T. Francis, Jr., 1969:
Interpretations of influenza antibody patterns of man.

Bull. Wld. Hlth. Org. 40, 453-460

Davenport, F. M., 1977:

Reflections on the epidemiology of myxovirus infections.

Med. Microbiol. Immunol. 164, 69-76

DeJong, J. C., F. M. DeRonde-Verloop, T. M. Veenendaal-vanHerk, T. F. Weijers, K. Bulsma, A. D. M. E. Osterhaus, 1988:

Antigenic heterogeneity within influenza A(H3N2) virus strains.

Bull. Wld. Hlth. Org. 66, 47-55

Deom, C. M., A. J. Caton, I. T. Schulze, 1986:

Host cell-mediated selection of a mutant influenza A virus that has lost a complex oligosaccharide from the tip of the hemagglutinin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3771-3775

Desselberger, U. S., P. Palese, 1978:

Molecular weights of RNA segments of influenza A and B viruses.

Virology 88, 394-399

Desselberger, U. S., K. Nakajima, P. Alifino, F. S. Pedersen, W. A. Haseeltine, C. Hannoun, P. Palese, 1978:

Biochemical evidence that new influenza virus strains in nature may arise by recombination (reassortment).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3341-3345

DiCamugliano, G. N., 1933:

The chronicles of a Florentine family,

1200-1470.

Dorset, M., C. N. McBryde, W. B. Niles, 1922:

Remarks on "hog flu".

J. Amer. Vet. Med. Assoc. 62, 162-171

Easterday, B. C., 1975:

Swine influenza.

In: Diseases of swine. Dunne, H. W., A. D. Leman (Hrsg.), 4. Aufl.,

Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 141-167

Easterday, B. C., 1981:

Swine influenza.

In: Diseases of swine. Leman, A. D. (Hrsg.), 5. Aufl., Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 181-194

Francis, T., A. Moore, 1940:

A study of the neurotropic tendency in strains of the virus of epidemic influenza.

J. Exp. Med. 72, 717-728

Geisler, B., W. Seidel, B. Herrmann, L. Döhner, 1986:

Differences of nucleoproteins of human and avian influenza A virus strains shown by polyacrylamide gel electrophoresis and by the peptide mapping technique.

Arch. Virol. 90, 289-299

Geraci, J. R., D. J. St.Aubin, I. K. Barker, R. G. Webster, V. S. Hins-
haw, W. J. Bean, H. L. Ruhnke, J. H. Prescott, G. Early, A. S. Baker, S.
Madoff, R. T. Schooley, 1982:

Mass mortality of harbor seals: Pneumonia associated with influenza A
virus.

Science 215, 1129-1131

Gerhard, W., R. G. Webster, 1978:

Antigenic drift in influenza A viruses. I. Selection and characteriza-
tion of antigenic variants of A/PR/8/34 (HON1) influenza virus with mo-
noclonal antibodies.

J. Exp. Med. 148, 383-392

Gerhard, W., J. Yewdell, M. E. Frankel, R. G. Webster, 1981:

Antigenic structure of influenza virus hemagglutinin defined by hybrido-
ma antibodies.

Nature 290, 713-717

Gething, M. J., J. M. White, M. D. Waterfield, 1978:

Purification of the fusion protein of Sendai virus: Analysis of the N-
terminal sequence generated during precursor activation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2737-2740

Ghendon, Y., A. Klimov, N. Gorodkova, L. Döhner, 1981:

Genome analysis of influenza virus strains isolated during an epidemic
of 1979-1980.

J. gen. Virol. 56, 303-313

Gompels, A. E. H., 1953:

Antigenic relationships of swine influenza virus.

J. gen. Microbiol. 9, 140-148

Gorreau, J. M., Kaiser, C., Hannoun, C., Vaissaire, J., Gayot, G., 1980:

Premier isolement en France du virus de l'influenza du porc (Hsw1N1)
dans un environnement pathologique plurimicrobien.

Bull. Acad. Vet. (France) 53, 181-188

Gottschalk, A., 1954:

The influenza virus enzyme and its mucoprotein substrate.

Yale J. Biol. Med. 26, 352-364

Harnach, R., R. Hubik, O. Chvatal, 1950:

Isolation of the virus of swine influenza in Czechoslovakia.

Cas. ceskoslov. Vet. 5, 289

Hay, A. J., B. Lomniczi, A. R. Bellamy, J. J. Skehel, 1977:

Transcription of the influenza virus genome.

Virology 83, 337-355

Hinshaw, V. S., R. G. Webster, B. Turner, 1978a:

Novel influenza A viruses isolated from Canadian feral ducks: including strains antigenically related to swine influenza (Hsw1N1) viruses.

J. Gen. Virol. 41, 115-127

Hinshaw, V. S., W. J. Bean, Jr., R. G. Webster, B. C. Easterday, 1978b:

The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine.

Virology 84, 51-62

Hinshaw, V. S., R. G. Webster, R. J. Rodriguez, 1979a:

Influenza A viruses: combinations of hemagglutinin and neuraminidase subtypes isolated from animals and other sources.

Arch. Virol. 62, 281-290

Hinshaw, V. S., R. G. Webster, B. Turner, 1979b:

Water-borne transmission of influenza A viruses.

Intervirology 11, 66-68

Hinshaw, V. S., W. J. Bean, R. G. Webster, G. Sriram, 1980:

Genetic reassortment of influenza A viruses in the intestinal tract of ducks.

Virology 102, 412-419

Hinshaw, V. S., R. G. Webster, B. C. Easterday, W. J. Bean, 1981:

Replication of avian influenza A viruses in mammals.

Infect. Immun. 34, 354-361

Hinshaw, V. S., G. M. Air, A. J. Gibbs, L. Graves, B. Prescott, D. Karunakaran, 1982:

Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza viruses from gulls.

J. Virol. 42, 865-872

Hinshaw, V. S., D. J. Alexander, M. Aymard, P. A. Bachmann, B. C. Easterday, C. Hannoun, H. Kida, M. Lipkind, J. S. MacKenzie, K. Nerome, G. C. Schild, C. Scholtissek, D. A. Senne, K. F. Shortridge, J. J. Skehel, R. G. Webster, 1984:

Antigenic comparisons of swine-influenza-like H1N1 isolates from pigs, birds and humans: an international collaborative study.

Bull. Wld. Hlth. Org. 62, 871-878

Hirst, G. K., 1941:

The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos, infected with influenza virus.

Science 94, 22-23

Hirst, G. K., 1942:

The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination.

J. Exp. Med. 75, 49-64

Hiti, A. L., A. R. Davis, D. P. Nayak, 1981:

Complete sequence analysis shows that the hemagglutinins of the H0 and H2 subtype of human influenza virus are closely related.

Virology 111, 113-124

Horisberger, M. A., 1980:

The large P proteins of influenza A viruses are composed of one acidic and two basic polypeptides.

Virology 107, 302-305

Jackson, D. C., A. Nestorowicz, 1985:

Antigenic determinants of influenza virus hemagglutinin. XI. Conformational changes detected by monoclonal antibodies.

Virology 145, 72-83

Jensen, K. E., W. D. Peterson, Jr., 1957:

Comparative measurements of antigenic differences among human and swine influenza viruses.

J. Immunol. 78, 365-372

Kaplan, M. M., R. G. Webster, 1977:

The epidemiology of influenza.

Sci. American 237, 88-105

Katz, J. M., R. G. Webster, 1988:

Antigenic and structural characterization of multiple subpopulations of H3N2 influenza virus from an individual.

Virology 165, 446-456

Kawaoka, Y., R. G. Webster, 1985:

Evolution of the A/chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza virus.

Virology 146, 130-137

Kawaoka, Y., T. M. Chambers, W. L. Sladen, R. G. Webster, 1988:

Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks?

Virology 163, 247-250

Kendal, A. P., M. Goldfield, G. R. Noble, W. R. Dowdle, 1977a:

Identification and preliminary antigenic analysis of swine influenza-like virus isolated during an influenza outbreak at Fort Dix, New Jersey.

J. Infect. Dis. 136, (Supplement) 381

- Kendal, A. P., G. R. Noble, W. R. Dowdle, 1977b:
Swine influenza viruses isolated in 1976 from man and pig contain two coexisting subpopulations with antigenically distinguishable hemagglutinins.
Virology 82, 111-121
- Kendal, A. P., G. R. Noble, J. J. Skehel, W. R. Dowdle, 1978:
Antigenic similarity of influenza A (H1N1) viruses from epidemics in 1977-1978 to "Scandinavian" strains isolated in epidemics of 1950-1951.
Virology 89, 632-636
- Kida, H., Y. Kawaoka, C. W. Naeve, R. G. Webster, 1987:
Antigenic and genetic conservation of H3 influenza virus in wild ducks.
Virology 159, 109-119
- Kida, H., K. F. Shortridge, R. G. Webster, 1988:
Origin of the hemagglutinin gene of H3N2 influenza viruses from pigs in China.
Virology 162, 160-166
- Kilbourne, E. D., W. Gerhard, C. W. Whitaker, 1983:
Monoclonal antibodies to the hemagglutinin Sa antigenic site of A/PR/8/34 influenza virus distinguish biological mutants of swine influenza virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6399-6402
- Klenk, H. D., R. Rott, M. Ohrlich, J. Blodorn, 1975:
Activation of influenza A viruses by trypsin treatment.
Virology 68, 426-439
- Klenk, H. D., R. Rott, M. Ohrlich, 1977:
Further studies on the activation of influenza virus by proteolytic cleavage of the hemagglutinin.
J. gen. Virol. 36, 151-161
- Koen, J. S., 1919:
A practical method for field diagnosis of swine diseases.
Amer. J. Vet. Med. 14, 468

Köhler, G., L. Milstein, 1975:

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature 256, 495-497

Kundin, W. D., 1970:

Hong Kong A 2 influenza virus infection among swine during human epidemic in Taiwan.

Nature 228, 857

Lamb, R. A., P. W. Choppin, 1983:

The gene structure and replication of influenza virus.

Ann. Rev. Biochem. 52, 467-506

Lamont, H. G., 1938:

The problems of the practitioner in connection with the differential diagnosis and treatment of diseases of young pigs.

Vet. Rec. 50, 1377

Laver, W. G., G. M. Air, R. G. Webster, W. Gerhard, C. W. Ward, T. A. A. Dopheide, 1979:

Antigenic drift in type A influenza virus: sequence differences in the hemagglutinin of Hong Kong (H3N2) variants selected with monoclonal hybridoma antibodies.

Virology 98, 226-237

Lazarowitz, S. G., A. Goldberg, P. W. Choppin, 1973:

Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus: Host cell activation of serum plasminogen.

Virology 56, 172-180

Lazarowitz, S. G., P. W. Choppin, 1975:

Enhancement of infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the haemagglutinin polypeptide.

Virology 68, 440-454

Lubeck, M. D., W. Gerhard, 1981:

Topographical mapping of antigenic sites on the influenza A/PR/8/34 virus hemagglutinin using monoclonal antibodies.

Virology 113, 64-72

Lvov, D. K., V. M. Zhdavon, A. A. Sazonov, N. A. Braude, E. A. Vladimirtceva, L. V. Agafonova, et al., E. I. Skljanskaja, N. V. Kaverin, V. I. Reznik, T. V. Pysina, A. M. Oserovic, A. A. Berzin, I. A. Mjasnikova, R. Y. Podcernjaeva, S. M. Klimenko, V. P. Andrejev, M. A. Yakhno, 1978: Comparison of influenza viruses isolated from man and from whales.

Bull. Wld. Hlth. Org. 56, 923-930

Masurel, N., 1969:

Relation between Hong Kong virus and former influenza A2 isolates and the A/Equi-2 virus in human sera collected before 1957.

Lancet i, 907-910

Maxam, A. M., W. Gilbert, 1977:

A new method for sequencing DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560-564

McBride, C. N., 1927:

Some observations on "hog flu" and its seasonal prevalence in Iowa.

J. Amer. Vet. Med. Assoc. 71, 368-377

McGeoch, C., P. Fellner, C. Newton, 1976:

Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3045-3049

Meier-Ewert, H., A. J. Gibbs, N. J. Dimmock, 1970:

Studies on antigenic variations of the haemagglutinin and neuraminidase of swine influenza virus isolates.

J. gen. Virol. 6, 409-419

Moore, B. W., R. G. Webster, W. J. Bean, K. L. Van Wyke, W. G. Laver, M. G. Evered, J. C. Downie, 1981:

Reappearance in 1979 of a 1968 Hong Kong-like influenza virus.

Virology 109, 219-222

Naeve, C. W., V. S. Hinshaw, R. G. Webster, 1984:

Mutations in the hemagglutinin receptor-binding site can change the biological properties of an influenza virus.

J. Virol. 51, 567-569

Nakajima, K., U. Desselberger, P. Palese, 1978:

Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950.

Nature 274, 334-339

Nakajima, K., S. Nakajima, K. Nerome, Y. Takeuchi, A. Sugiura, A. Oya, 1979:

Genetic relatedness of some 1978-1979 influenza H1N1 strains to 1953 H1N1 strain.

Virology 99, 423-426

Nakajima, K., Nakajima, S., K. F. Shortridge, A. P. Kendal, 1982:

Further genetic evidence for maintenance of early Hong Kong-like influenza A(H3N2) strains in swine until 1976.

Virology 116, 562-572

Nakajima, S., Nakajima K., A. P. Kendal, 1983:

Identification of the binding sites to monoclonal antibodies on A/USSR/90/77 (H1N1) hemagglutinin and their involvement in antigenic drift in H1N1 influenza viruses.

Virology 131, 116-127

Nakajima, K., E. Nobusawa, S. Nakajima, 1984:

Genetic relatedness between A/swine/Iowa/15/30 (H1N1) and human influenza viruses.

Virology 139, 194-198

Nakajima, K., E. Nobusawa, T. Ogawa, S. Nakajima, 1987:

Genetic divergence of the NS genes of avian influenza viruses.

Virology 158, 465-468

- Nakamura, R. M., B. C. Easterday, R. Pawlisch, G. L. Walker, 1972:
Swine influenza: epizootiological and serological studies.
Bull. Wld. Hlth. Org. 47, 481-487
- Nardelli, L., S. Pascicci, G. L. Gualandi, P. Loda, 1978:
Outbreaks of classical swine influenza in Italy in 1976.
Zbl. Vet. Med. B 26, 1271-1282
- Nerome, K., M. Ishida, A. Oya, C. Kanai, K. Suwicha, 1982:
Isolation of an influenza H1N1 virus from a pig.
Virology 117, 485-489
- Nobusawa, E., K. Nakajima, 1988:
Amino acid substitution at position 226 of the hemagglutinin molecule of
influenza (H1N1) virus affects receptor binding activity but not fusion
activity.
Virology 167, 8-14
- O'Brien, R. J., G. R. Noble, B. C. Easterday, A. P. Kendal, D. M. Shas-
by, D. B. Nelson, M. A. W. Hattwick, W. R. Dowdle, 1977:
Swine influenza virus infection in a Wisconsin farm family.
J. Inf. Dis. 136, 390-396
- Ottis, K., P. A. Bachmann, 1980:
Occurrence of Hsw1N1 subtype influenza A viruses in wild ducks in
Europe.
Arch. Virol. 63, 185-190
- Ottis, K., W. Bollwahn, P. A. Bachmann, K. Heinritzi, 1981:
Ausbruch von Schweineinfluenza in der Bundesrepublik Deutschland: Kli-
nik, Nachweis und Differenzierung.
Tierärztl. Umschau 36, 608-612
- Oxford, J. S., T. Corcoran, R. Knott, J. Bates, O. Bartolomei, D. Major,
R. W. Newman, P. Yates, J. Robertson, R. G. Webster, G. C. Schild, 1987:
Serological studies with influenza A(H1N1) viruses cultivated in eggs or
in a canine kidney cell line (MDCK).
Bull. Wld. Hlth. Org. 65, 181-187

Pensaert, M., K. Ottis, J. Vandeputte, M. M. Kaplan, P. A. Bachmann,
1981:

Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild
ducks to swine and its potential importance for man.

Bull. Wld. Hlth. Org. 59, 75-78

Porter, A. G., C. Barber, N. H. Carey, R. A. Hallewell, G. Threlfall, J.
S. Emtage, 1979:

Complete nucleotide sequence of an influenza virus hemagglutinin gene
from cloned DNA.

Nature 282, 471-477

Raymond, F. L., A. J. Caton, N. J. Cox, A. P. Kendal, G. G. Brownlee,
1986:

The antigenicity and evolution of influenza H1 haemagglutinin, from
1950-1957 and 1977-1983: Two pathways from one gene.

Virology 148, 275-287

Robbins K. C., L. Summaria, 1970:

Human plasminogen and plasmin.

In: Methods in Enzymology. Perlman, G., L. Lorand (Hrsg.), Vol. 19, 184-
199

Robertson, J. S., J. S. Bootman, R. Newman, J. S. Oxford, R. S. Daniels,
R. G. Webster, G. C. Schild, 1987:

Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation
of an influenza A(H1N1) virus.

Virology 160, 31-37

Rogers, G. N., J. C. Paulson, R. S. Daniels, J. J. Skehel, I. A. Wilson,
D. C. Wiley, 1983:

Single amino acid substitutions in influenza hemagglutinin change
receptor-binding specificity.

Nature 304, 76-79

- Rogers, G. N., R. S. Daniels, J. J. Skehel, D. C. Wiley, X.-F. Wang, H. H. Higa, J. C. Paulson, 1985:
Host-mediated selection of influenza receptor variants. Sialic acid alpha 2,6Gal specific clones of A/duck/Ukraine/1/63 revert to sialic acid alpha 2,3Gal-specific wild type in ovo.
J. Biol. Chem. 260, 7362-7367
- van Rooyen, C. E., L. McClelland, E. V. Campbell, 1949:
Influenza in Canada during 1949.
Canad. J. Publ. Hlth. 40, 447-456
- Rott, R., C. Scholtissek, H.-D. Klenk, 1985:
Molekulare Aspekte der Influenza-Epidemiologie.
Internist 26, 89-93
- Sanger, F., S. Nicklen, A. R. Coulson, 1977:
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467
- Schäfer, W., 1955:
Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und der klassischen Geflügelpest.
Z. Naturforsch. 106, 81-91
- Schild, G. C., 1972:
Evidence for a new type-specific structural antigen of the influenza virus particle.
J. gen. Virol. 15, 99-103
- Schild, G. C., R. W. Newman, R. G. Webster, D. Major, V. S. Hinshaw, 1980:
Antigenic analysis of influenza A surface antigens: considerations for the nomenclature of influenza virus.
Arch. Virol. 63, 171-184
- Schnurrenberger, P. R., G. T. Woods, R. J. Martin, 1970:
Serological evidence of human infection with swine influenza virus.
Amer. Rev. Respir. Dis. 102, 356-361

- Scholtissek, C., W. Rhode, E. Harms, R. Rott, 1977:
Correlation between base sequence homology of RNA segment 4 and antigenicity of the hemagglutinin of influenza viruses.
Virology 79, 330-336
- Scholtissek, C., 1978:
The genome of the influenza virus.
Current Topics in Microbiology and Immunology 80, 139-169
- Scholtissek, C., V. von Hoyningen, R. Rott, 1978:
Genetic relatedness between the new 1977 epidemic strains (H1N1) of influenza and human influenza strains isolated between 1947 and 1957 (H1N1).
Virology 89, 613-617
- Scholtissek, C., H. Bürger, P. A. Bachmann, C. Hannoun, 1983:
Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds.
Virology 129, 521-523
- Scholtissek, C., H. Bürger, O. Kistner, K. F. Shortridge, 1985:
The nucleoprotein as a major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses.
Virology 147, 287-294
- Shope, R. E., 1931 a:
Swine influenza. I. Experimental transmission and pathology.
J. Exp. Med. 54, 349-359
- Shope, R. E., 1931 b:
Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology.
J. Exp. Med. 54, 373-385
- Shope, R. E., 1936:
The incidence of neutralizing antibodies for swine influenza virus in the serum of human beings of different ages.
J. Exp. Med. 63, 669-684

Shope, R. E., 1938:

Serological evidence for the occurrence of infection with human influenza virus in swine.

J. Exp. Med. 67, 739-748

Shortridge, K. F., R. G. Webster, W. K. Butterfield, C. H. Campbell, 1976:

Persistence of Hong Kong influenza virus variant in pigs.

Science 196, 1454-1455

Shortridge, K. F., A. Cherry, A. P. Kendal, 1979:

Further studies of the antigenic properties of H3N2 strains of influenza A isolated from swine in South East Asia.

J. gen. Virol. 44, 251-254

Shortridge, K. F., C. H. Stuart-Harris, 1982:

An influenza epicentre (Southern China)?

Lancet II, 812-813

Shortridge, K. F., A. P. King, R. G. Webster, 1987:

Characterization of H3N2 influenza viruses that persist in pigs in "China" with monoclonal antibodies.

J. Infect. Dis. 155, 577-581

Skehel, J. J., M. D. Waterfield, 1975:

Studies on the primary structure of the influenza virus hemagglutinin.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 94/95, 2-74

Skehel, J. J., P. M. Bayley, E. M. Brown, S. R. Martin, M. D. Waterfield, J. M. White, I. A. Wilson, D. C. Wiley, 1982:

Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membran fusion.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 968-972

Skehel, J. J., R. S. Daniels, A. R. Douglas, D. C. Wiley, 1983:

Antigenic and amino acid sequence variations in the haemagglutinins of type A influenza viruses recently isolated from human subjects.

Bull. Wld. Hlth. Org. 61, 671-676

Smith, W. C., C. H. Andrewes, P. P. Laidlaw, 1933:

A virus obtained from influenza patients.

Lancet, ii, 66-68

Smith, T. F., E. O. Burgert, W. R. Dowdle, G. R. Noble, R. E. van Scoy, 1976a:

Isolation of swine influenza virus from autopsy lung tissue of man.

N. Engl. J. Med. 294, 708-710

Smith, J. W., R. Tannous, E. Thompson, R. G. Webster, 1976b:

Swine influenza in Hodgkin's disease.

N. Engl. J. Med. 295, 732

Sriram, G., W. J. Bean, Jr., V. S. Hinshaw, R. G. Webster, 1980:

Genetic diversity among avian influenza viruses.

Virology 105, 592-599

Stevens, D. J., A. R. Douglas, J. J. Skehel, D. C. Wiley, 1987:

Antigenic and amino acid sequence analysis of the variants of H1N1 influenza virus in 1986.

Bull. Wld. Hlth. Org. 65, 177-180

Stuart-Harris, C. H., 1939:

A neurotropic strain of human influenza virus.

Lancet i, 497-499

Stuart-Harris, Sir, C. H., G. C. Schild, J. S. Oxford, 1985:

Influenza. The viruses and the disease. 2. Aufl. E. Arnold, London.

Stubbs, E. L., 1965:

Fowl plague.

In: Diseases in poultry. Biester, H. E., D. D. Schwarte (Hrsg.), 5.

Aufl., Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Sugimura, T., H. Yonemochi, T. Ogawa, Y. Tanaka, T. Kumagai, 1980:

Isolation of a recombinant influenza virus (Hsw1N2) from swine in Japan.

Arch. Virol. 66, 271-274

Szewczyk, B., W. G. Laver, D. F. Summers, 1988:

Purification, thioredoxin renaturation, and reconstituted activity of the three subunits of the influenza A virus RNA polymerase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7909-7911

Thompson, E. S., 1890:

Influenza: an historical survey of past epidemics in Great Britain from 1519 to 1890. Percival, London.

Top, F. H. Jr., P. K. Russell, 1977:

Swine influenza A at Fort Dix, New Jersey (January-February 1976).

IV. Summary and speculation.

J. Inf. Dis. 136, (Supplement), S376-S380

Tumova, B., A. Stumpa, J. Mensik, 1980:

Surveillance of influenza in pig herds in Czechoslovakia in 1974-1979.

2. Antibodies against influenza A (H3N2), A (Hsw1N1) and A (H1N1) viruses.

Zbl. Vet. Med. B 27, 601-607

Tumova, B., A. Stumpa, V. Madr, J. Mensik, 1985:

Antibodies to new variants of subtype A (H3N2) influenza virus in pigs.

Acta virologica 29, 150-153

Ulmanen, I., B. A. Broni, R. M. Krug, 1981:

Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures ($m^7GpppNm$) on RNAs and in initiating viral RNA transcription.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7355-7359

Underwood, P. A., 1982:

Mapping of antigenic changes in the haemagglutinin of Hong Kong influenza (H3N2) strains using a large panel of monoclonal antibodies.

J. gen. Virol. 62, 153-169

Underwood, P. A., 1984:

An antigenic map of the haemagglutinin of the influenza Hong Kong subtype (H3N2), constructed using mouse monoclonal antibodies.

Mol. Immunol. 21, 663-671

- Underwood, P. A., J. J. Skehel, D. C. Wiley, 1987:
Receptor-binding characteristics of monoclonal antibody-selected antigenic variants of influenza virus.
J. Virol. 61, 206-208
- Vandeputte, J., M. Pensaert, F. Castryck, 1980:
Serologische diagnose en onderzoek naar verspreiding van het varkens-influenza-virus in België.
Vlaams diergeneesk. Tijdschr. 49, 1-7
- Vaughan, W. T., 1921:
Influenza - an epidemiologic study.
Am. J. Hyg. Monograph 1,1
- Verhoeven, M., R. Fang, W. Min Jou, D. Huylebroeck, E. Saman, W. Fiers, 1980:
Antigenic drift between the hemagglutinin of the Hong Kong influenza strains A/Aichi/2/68 and A/Victoria/3/75.
Nature 286, 771-776
- de Wachter, R., W. Fiers, 1972:
Preparative two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of ^{32}P -labeled RNA.
Anal. Biochem. 49, 184-197
- Ward, C. W., 1981:
Structure of the influenza virus hemagglutinin.
Curr. Top. Microbiol. Immun. 94, 1-74
- Waterfield, M. D., M. J. Gething, G. Scrace, J. J. Skehel, 1980:
The carbohydrate side chains and disulphide bonds of the haemagglutinin of the influenza virus A/Japan/305/57 (H2N1).
In: Structure and variation in influenza virus. Laver, W. G., G. M. Air (Hrsg.), Elsevier, North Holland, 11-20

Webster, R. G., M. Yakhno, V. S. Hinshaw, W. J. Bean, K. G. Murti, 1978:
Intestinal influenza: replication and characterization of influenza vi-
ruses in ducks.

Virology 84, 268-278

Webster, R. G., V. S. Hinshaw, W. J. Bean, K. L. Van Wyke, J. R. Geraci,
D. J. St.Aubin, G. Petursson, 1981:

Characterization of an influenza A virus from seals.

Virology 113, 712-724

Webster, R. G., W. G. Laver, G. M. Air, G. C. Schild, 1982:

Molecular mechanisms of variation in influenza viruses.

Nature 296, 115-121

Webster, R. G., Y. Kawaoka, W. J. Bean, Jr., 1986:

Molecular changes in A/chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza virus
associated with acquisition of virulence.

Virology 149, 165-173

Weis, W., J. H. Brown, S. Cusack, J. C. Paulson, J. J. Skehel, D. C.

Wiley, 1988:

Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its re-
ceptor, sialic acid.

Nature 333, 426-431

Wharton, S. A., R. W. H. Ruigrok, S. R. Martin, J. J. Skehel, P. M.

Bayley, W. Weis, D. C. Wiley, 1988a:

Conformational aspects of the acid-induced fusion mechanism of influenza
virus hemagglutinin.

J. Biol. Chem. 263, 4474-4480

Wharton, S. A., W. Weis, J. J. Skehel, D. C. Wiley, 1988b:

The structure, function and antigenicity of the haemagglutinin of influ-
enza virus.

In Vorbereitung

- White, J., J. Kartenbeck, A. Helenius, 1982:
Membrane fusion activity of influenza virus.
EMBO J. 1, 217-222
- Wiley, D. C., I. A. Wilson, J. J. Skehel, 1981:
Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation.
Nature 289, 373-378
- Wiley, D. C., J. J. Skehel, 1987:
The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus.
Ann. Rev. Biochem. 56, 365-394
- Wilson, I. A., J. J. Skehel, D. C. Wiley, 1981:
Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution.
Nature 289, 366-373
- Winter, G., S. Fields, G. G. Brownlee, 1981:
Nucleotide sequence of the haemagglutinin gene of a human influenza virus H1 subtype.
Nature 292, 72-75
- Witte, K. H., H. Nienhoff, H. Ernst, U. Schmidt, D. Prager, 1981:
Erstmaliges Auftreten einer durch Schweineinfluenzavirus verursachten Epizootie in Schweinebeständen der Bundesrepublik Deutschland.
Tierärztl. Umsch. 36, 591-606
- Yamashita, M., M. Krystal, W. M. Fitch, P. Palese, 1988:
Influenza B virus evolution: Co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses.
Virology 163, 112-122
- Yewdell, J. W., A. J. Caton, W. Gerhard, 1986:
J. Virol. 57, 623-628
(zitiert nach Daniels et al., 1987)

Yoden, S., H. Kida, R. Yanagawa, 1985:

Is bivalent binding of monoclonal antibodies to different antigenic areas on the haemagglutinin of influenza virus required for neutralization of viral infectivity?

Arch. Virol. 85, 209-216

Die vorliegende Arbeit wurde an der Abteilung Virologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Meier-Ewert möchte ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken. Seine zahlreichen Anregungen und die stets gewährte freundliche Unterstützung haben wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr danke ich herzlich für die Vertretung dieser Arbeit vor der Tierärztlichen Fakultät.

Besonders in Erinnerung behalten möchte ich Herrn Prof. Dr. P. A. Bachmann, der in der kurzen verbliebenen Zeit den Grundstein zu dieser Arbeit gelegt hat.

Allen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

LEBENS LAUF

Am 22. Oktober 1958 wurde ich, Elisabeth Rita Maria Neumeier, als Tochter des Landmaschinenkaufmanns Martin Neumeier und seiner Frau Maria, geb. Widmann, in Geisenhausen geboren.

- | | |
|-----------------------|---|
| 1965 - 69 | Grundschule Gerzen |
| 1969 - 78 | Gymnasium Seligenthal, Landshut |
| 1978 - 83 | Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München |
| Dez. 1983 | Abschluß mit Staatsexamen |
| Apr. 1984 | Beginn der vorliegenden Arbeit an der Abteilung für Virologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität München. |
| Apr. 1985 | Erteilung der Approbation |
| Jan. 1985 - Nov. 1986 | Wissenschaftliche Hilfskraft, Technische Universität, München |

